

## THESIS / THÈSE

### DOCTEUR EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

#### Maîtrise de la reproduction de la race caprine Beni Arouss au Nord du Maroc

El Kadili, Sara

*Award date:*  
2019

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**UNIVERSITÉ  
DE NAMUR**

---

FACULTÉ  
DES SCIENCES

# **Maîtrise de la reproduction de la race caprine Beni Arouss au Nord du Maroc**

Dissertation présentée par  
**SARA EL KADILI**  
En vue de l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences Vétérinaires

Composition du jury :

Prof. Nathalie Kirschvink (Promoteur, Université de Namur)  
Dr. Mouad Chentouf (Co-promoteur, INRA Maroc)  
Prof. Jean-Loup Bister (Université de Namur)  
Ir. Marianne Raes (Université de Namur)  
Prof. Jean-François Beckers (Université de Liège)  
Prof. Bouchaib Archi (Ecole Nationale d'Agriculture, Maroc)  
Prof. Isabelle Donnay (Université catholique de Louvain)  
Dr. Francisco Arrebola Molina (IFAPA, Espagne)  
Prof. Jean-Michel Vandeweerdt (Président de jury, Université de Namur)

## RESUME

Cette thèse a pour objectifs de caractériser en fonction de la saison l'activité de reproduction et l'aptitude de conservation à l'état liquide de la semence chez les boucs de la race Beni Arouss et de mettre au point des protocoles pour la maîtrise de la reproduction chez la chèvre de cette race. L'activité de reproduction et l'aptitude de conservation de la semence ont été étudiées mensuellement au cours des quatre saisons de l'année. Le volet consacré à la mise au point des protocoles d'induction et de synchronisation d'œstrus et d'ovulation chez la chèvre Beni Arouss en anœstrus et en saison sexuelle a concerné au départ la comparaison de l'efficacité de protocoles dits « classiques » avant de tester l'efficacité d'un protocole alternatif basé sur l'utilisation de l'effet bouc.

La caractérisation en fonction de la saison de l'activité de reproduction chez les boucs Beni Arouss ( $n = 7$ ) a montré que la taille testiculaire varie en fonction de la saison avec les mensurations les plus élevées obtenues en été et en automne. La plupart des caractères liés au comportement sexuel n'ont pas été influencés par la saison, à l'exception du nombre de sauts avant la première éjaculation qui était plus faible en été. Concernant les caractéristiques de la semence, la concentration en spermatozoïdes, la viabilité et le pourcentage de spermatozoïdes normaux ont été inférieurs pendant la saison hivernale. La taille des têtes de spermatozoïdes, mesurée à l'aide du système CASA, a été significativement plus grande en automne et l'activité des spermatozoïdes, évaluée par le même système en terme de motilité et vitesses de progression, a été accrue en été et automne. Le score de performance reproductive global établi pour chaque individu a confirmé que pour l'ensemble des boucs, une amélioration de la performance de reproduction a été enregistrée en été et en automne.

Afin d'évaluer l'effet de la saison sur la qualité de conservation à l'état liquide de la semence chez les boucs Beni Arouss des éjaculats récoltés mensuellement de sept boucs matures ont été conservés à 16 °C pendant 24 h dans un dilueur synthétique à une concentration finale de  $800 \times 10^6$  spermatozoïdes.  $\text{ml}^{-1}$ . La motilité, la viabilité et la morphologie du sperme ont été évaluées à 0, 4, 8 et 24 h après conservation. La qualité de la semence a diminué progressivement entre 0 et 24 heures de conservation indépendamment de la saison de l'année. Néanmoins, après 24 heures de conservation, le sperme récolté en été a été de meilleure qualité (19 – 29% de baisse de qualité) que celui récolté en automne (28 – 46% de baisse de qualité) ou lors des autres saisons de faible reproduction.

Ainsi, la saison influence les caractéristiques du sperme chez le bouc Beni Arouss avec une meilleure aptitude de conservation à 16° C obtenue en été.

La comparaison de l'efficacité de huit combinaisons d'acétate de fluorogestone (FGA, 20 ou 40 mg comme éponge vaginale insérée pendant 11 jours), de gonadotrophine chorionique équine (eCG, 300 ou 500 UI injectée 48 heures avant le retrait d'éponge) et de PGF2alpha (cloprosténol, 0 ou 50 µg injectée 48h avant le retrait d'éponge) pour l'induction et la synchronisation d'œstrus et d'ovulation chez la chèvre Beni Arouss a été réalisée en anœstrus saisonnier (printemps,  $n = 64$ ) et en saison sexuelle (automne,  $n = 58$ ). La détection des chaleurs a été réalisée entre 12 et 60 h après le retrait d'éponges. Des prélèvements sanguins permettant de déterminer le moment du pic pré-ovulatoire de LH et l'augmentation de la progestérone en tant que signe d'un corps jaune actif ont été effectués respectivement entre 20 et 60 heures et 3, 5, 8 et 15 jours après le retrait d'éponges. D'après les résultats, l'ensemble des traitements hormonaux appliqués ont été efficaces pour induire et synchroniser l'œstrus et l'ovulation en période d'anœstrus et en saison sexuelle chez la chèvre Beni Arouss et la saison a influencé significativement le moment d'induction d'œstrus et du pic pré-ovulatoire de LH : Aucun effet

de la saison (printemps par rapport à l'automne) sur la réponse œstrale (95% contre 93%,  $p > 0,05$ ), le pic pré-ovulatoire de LH (94% contre 84%,  $p > 0,05$ ) et la réponse lutéale après 3 à 8 j et après 11 à 15 j après fin de traitement (respectivement 92% contre 66% et 92% contre 98% ;  $p > 0,05$ ) n'a été enregistré. L'induction d'œstrus (21 [13-53] vs 32 [12-54] heures ;  $P < 0,05$ ) et du pic pré-ovulatoire de LH (26 [20-60] vs 38 [22-60] heures ;  $P < 0,05$ ) a été tardive en automne. L'utilisation des éponges imprégnées de 40 mg a retardé significativement la réponse ovarienne en saison sexuelle par rapport à l'anœstrus : la réponse œstrale a été enregistrée après (36 [16-54] vs 23 [12-47] heures ;  $P < 0,05$ ) et le pic pré-ovulatoire de LH (44 [26-58] vs 33 [22-60] heures ;  $P < 0,05$ ). Des différences significatives en fonction du traitement ont été enregistrées pour le délai du pic de LH (au plus tôt pour 20 mg de FGA, 300 UI d'eCG, 50 µg de PGF2alpha) et l'induction de la phase lutéale (au plus tard pour 40 mg de FGA, 300 UI d'eCG, 50 µg de PGF2alpha).

Afin d'évaluer l'effet bouc en guise de remplacement de l'eCG sur l'induction et la synchronisation d'œstrus et d'ovulation en période d'anœstrus et en saison sexuelle chez la chèvre Beni Arouss, quatre boucs mâles ont été traités photopériodiquement 5 mois avant le début de l'étude avec 75 jours de jours longs (16 h de lumière et 8 h d'obscurité par jour), suivis par un retour à l'éclairement naturel afin de stimuler leur activité sexuelle. En période d'anœstrus et en saison sexuelle, quarante-cinq chèvres ont été assignées en fonction de leur âge et poids vif à trois traitements. Les femelles du groupe 1 ont été traitées pendant 11 jours avec des éponges imprégnées de 20 mg de FGA combinées à 300 UI d'eCG et 50 µg de cloprosténol injectés par voie intramusculaire 48 heures avant le retrait d'éponge. Les chèvres stimulées par l'effet de bouc sexuellement actif dans les groupes 2 et 3 ont reçu un traitement alternatif dans lequel l'injection d'eCG a été remplacée par des mâles sexuellement actifs introduits 2 jours avant (groupe 3) ou au moment du retrait d'éponge (groupe 2) et ont été laissés avec les femelles pendant 3 jours. Entre 20 et 80 h après le retrait d'éponges, les chèvres des groupes 2 et 3 ont été observées pour la détection des chaleurs induites par les boucs. Des prélèvements sanguins permettant de déterminer le moment du pic pré-ovulatoire de LH et l'augmentation de la progestérone en tant que signe d'un corps jaune actif ont été effectués respectivement entre 20 et 80 heures et 3, 5, 8 et 15 jours après le retrait d'éponges chez les chèvres des 3 groupes. Les résultats ont montré qu'en anœstrus saisonnier, 77% des chèvres induites par l'effet bouc ont été en œstrus à des intervalles allant de 60 à 74 heures après le retrait d'éponge pour le groupe 3 et de 71 à 77 heures pour le groupe 2 ( $P < 0,05$ ). Dans le groupe 1, 77% des chèvres ont eu un pic pré-ovulatoire de LH dans un intervalle allant de 24 à 40 heures après le retrait d'éponge. Cependant, aucune des chèvres induites par l'effet mâle n'a montré un pic de LH endéans les 80 h ayant suivi le retrait d'éponge ni une phase lutéale endéans des 15 jours suivant le retrait d'éponge. 67% des chèvres du groupe 1 ont présenté une phase lutéale dans les 3 à 8 jours suivant le retrait d'éponge, qui s'est maintenue après 11-15 jours. Pendant la saison de reproduction, le pourcentage des chèvres en œstrus a atteint 100% dans les groupes soumis à l'effet bouc, avec un délai de chaleurs allant de 22 à 68 heures après le retrait d'éponge. Dans les trois groupes, la majorité des chèvres ont présenté un pic pré-ovulatoire de LH (84%) à un intervalle allant de 30 à 70 heures après le retrait d'éponge. Le pourcentage des chèvres présentant une phase lutéale dans les 3 à 8 jours suivant le retrait d'éponge n'a pas non plus différé entre les traitements (69% ;  $P > 0,05$ ). Après 11 à 15 jours et sans différence entre groupes, la majorité des chèvres a ovulé et une phase lutéale a été installée (91%). Ainsi, l'utilisation de l'effet bouc pour induire et synchroniser l'ovulation en période d'anœstrus saisonnier chez les chèvres Beni Arouss traitées avec 20 mg de FGA et 50 µg de cloprosténol n'est pas prometteuse. Cependant, le même protocole apparaît comme une

alternative intéressante à l'utilisation de l'eCG pour la synchronisation de l'œstrus et de l'ovulation pendant la saison sexuelle chez les chèvres Beni Arouss.

En conclusion, les recherches menées dans le cadre de cette thèse ont permis de montrer que :

- 1) Malgré qu'une performance de reproduction maximale chez les boucs Beni Arouss a été notée en été et automne, la reproduction peut être possible tout au long de l'année ;
- 2) La saison influence les caractéristiques du sperme avec une meilleure aptitude à la conservation à 16 °C obtenue en été. Néanmoins, l'utilisation de la semence conservée à 16°C pendant un maximum de 24 heures semble possible pendant toute l'année ;
- 3) L'induction et la synchronisation de l'œstrus et de l'ovulation est possible au moyen de différents traitements chez la chèvre Beni Arouss, que ce soit pendant la période d'anoestrus ou de reproduction. Le traitement basé sur l'insertion d'une éponge imprégnée de 20 mg de FGA pendant 11 jours, avec des injections intramusculaires de 300 UI d'eCG et 50 µg de cloprostenol 48 h avant le retrait d'éponge apparaît comme le meilleur compromis entre efficacité et réduction des doses utilisées ;
- 4) L'utilisation de l'effet bouc pour induire et synchroniser l'ovulation chez les chèvres Beni Arouss traitées avec 20 mg de FGA et 50 µg de cloprosténol apparaît comme alternative intéressante à l'utilisation de l'eCG pendant la saison sexuelle.

La validité de ces résultats générés dans un centre de recherche devra être vérifiée dans des conditions de terrain. Ensuite, ces acquis obtenus dans le cadre d'un projet de coopération, pourront implémenter les pratiques d'un futur centre d'insémination.

## ABSTRACT

This thesis aims (1) to characterize the impact of season on reproductive activity and liquid storage of semen in Beni Arouss bucks and (2) to develop protocols for reproduction control in goats of this breed. Reproductive activity and storage ability of semen were characterized monthly during the four seasons of the year. The section devoted to the development of protocols for oestrus and ovulation induction and synchronization in the Beni Arouss goat aimed to compare the effectiveness of so-called "classical" protocols before testing the efficacy of an alternative protocol based on the use of the buck effect for the induction and synchronization of oestrus and ovulation in the Beni Arouss goat during anoestrus and breeding season.

Seasonal characterization of reproductive activity in Beni Arouss bucks ( $n = 7$ ) revealed that testicular size varied significantly by season with the highest measurements recorded during summer and autumn. Most traits related to sexual behavior were not affected by season except the number of mounts before first ejaculation, which was lowest in summer. Regarding characteristics of semen, the sperm concentration, the viability and the percentage of normal sperm were lower during the winter season. The size of sperm heads, measured using the CASA system, was significantly higher in autumn and the activity of spermatozoa, evaluated by the same system in terms of motility and velocities, was increased in summer and autumn. The global reproductive performance score established for each buck confirmed an improved performance for all bucks during summer and autumn.

The effect of storage and season on Beni Arouss goat fresh semen by use of a synthetic extender was assessed by collecting ejaculates at monthly intervals by artificial vagina from seven mature bucks. After extending semen at a final concentration of  $800 \times 10^6$  spermatozoa.  $\text{ml}^{-1}$  it was stored at  $16^\circ\text{C}$  during 24 h. Semen motility, viability and normal morphology were assessed at 0, 4, 8 and 24 h after collection. As expected, motility, viability and normal morphology parameters showed a significant reduction within 24 h of storage and during all seasons. However, semen collected in summer maintained a better quality after 24 hours of storage at  $16^\circ\text{C}$  (19 – 29% of quality loss) than semen collected during autumn (28 – 46% of quality loss) or the other seasons. Therefore, the season affected the characteristics of Beni Arouss buck semen with a better storage ability at  $16^\circ\text{C}$  during summer.

The efficacy of eight combinations of fluorogestone acetate (FGA, 20 or 40 mg as intravaginal device during 11 days), equine chorionic gonadotropin (eCG, 300 or 500 IU injected 48 hours before FGA removal) and PGF2alpha (cloprostenol, 0 or 50  $\mu\text{g}$  injected 48h before FGA removal) aiming at induction and synchronization of oestrus and ovulation was evaluated during the anoestrus season (spring,  $n=64$ ) and during the breeding season (autumn,  $n=58$ ) in adult Beni Arouss goats. Oestrus behaviour was recorded between 12 and 60 hours after removal of FGA delivering device. Blood samplings allowing to assess onset of the preovulatory LH surge and increase of progesterone as sign of an active *corpus luteum* were performed respectively between 20 and 60 hours and 3, 5, 8 and 15 days after removal of FGA delivering device. All the hormone combinations tested appeared equally effective in terms of oestrus and ovulation rates in Beni Arouss goats during the anoestrus and the breeding season, and season significantly influenced onset of oestrus and LH surge: no season-related differences (spring versus autumn) were recorded for oestrus response (95% versus 93%,  $P > 0.05$ ), preovulatory LH surge (94% versus 84%,  $P > 0.05$ ) and luteal response after 3 to 8 and after 11 to 15 days after treatment (respectively 92% versus 66 % and 92 % versus 98%;  $P > 0.05$ ). Onset of oestrus (21 [13-53] versus 32 [12-54] hours;  $P < 0.05$ ) and LH surge (26 [20-60] versus 38 [22-60] hours;  $P < 0.05$ ) occurred significantly later in autumn. High dose

regimen of FGA (40 mg) delayed the ovarian response in autumn compared to spring: the onset of oestrus occurred 36 [16-54] versus 23 [12-47] hours ( $P < 0.05$ ) and of LH surge 44 [26-58] versus 33 [22-60] hours ( $P < 0.05$ ). Significant treatment-related differences were recorded for onset of LH surge (earliest for 20 mg FGA, 300 IU eCG, 50  $\mu$ g PGF2alpha) and onset of luteal phase (latest for 40 mg FGA, 300 IU eCG, 50  $\mu$ g PGF2alpha).

To assess the effect of eCG replacement by the buck effect on the induction and synchronization of oestrus and ovulation in Beni Arouss goat during anoestrus and during breeding season, four bucks were exposed to artificial long days (16 h of light and 8 h of darkness per day) during 75 days prior to anoestrus season, followed by a natural photoperiod to stimulate their sexual activity. During the anoestrus and during the sexual season, forty-five goats were assigned to three treatments according to their age and live weight. Goats of group 1 were treated for 11 days with vaginal sponges impregnated with 20 mg of FGA combined to 300 IU of eCG and 50  $\mu$ g of cloprostenol injected intramuscularly 48 h prior to sponge removal. Goats of group 2 and 3 were also treated with 20 mg of FGA and 50  $\mu$ g of cloprostenol, but eCG injection was replaced by a sexually active buck introduced 0 hours (group 2) or 48 hours (group 3) before FGA removal. Oestrus behavior and preovulatory LH surge were recorded between 20 and 80 hours after FGA sponge removal. The onset of a luteal phase was monitored by plasma progesterone measurement at day 3, 5, 8 and 15 after FGA removal. During the anoestrus season, 77 % of goats induced by the buck effect showed an oestrus at intervals ranging from 60 to 74 hours following sponge removal for group 3 and from 71 to 77 hours for group 2 ( $P < 0.05$ ). In group 1, 77 % of goats displayed a preovulatory LH surge between 24 and 40 hours after sponge removal and 67% developed a luteal phase, but no LH surge or luteal response was detected in goats of group 2 and 3. During the breeding season, oestrus response rate reached 100 % in goats synchronized with the buck effect with an interval ranging from 22 to 68 hours in groups 2 and 3 ( $P > 0.05$ ). In all groups, most of the goats displayed a preovulatory LH surge (84 %) at an interval ranging from 30 to 70 hours following sponge removal ( $P > 0.05$ ). The percentage of females displaying luteal phase within 3 to 8 days from sponge removal did not differ among groups (69 %;  $P > 0.05$ ). After 11 to 15 days, the occurrence of ovulation followed by normal luteal phase was raised in all groups and reached 91 % ( $P > 0.05$ ). In conclusion, the use of bucks failed to induce and to synchronize ovulation in Beni Arouss goats previously treated with 20 mg of FGA and 50  $\mu$ g of cloprostenol during anoestrus. However, the same protocol appears as an adequate alternative for oestrus and ovulation synchronization during the breeding season.

In conclusion, the studies performed during this doctoral research have shown that:

- 1) Beni Arouss bucks' semen quality undergoes seasonal changes and reaches its maximum in autumn; semen quality appears however compatible with fertilization throughout the year;
- 2) Semen storage at 16°C is also submitted to seasonal changes, the lowest storage-related quality loss being recorded in summer. Semen quality after 24 hours of storage seems compatible with IA requirements throughout the year;
- 3) Induction and synchronization of oestrus and ovulation using different hormonal treatments is possible in Beni Arouss goats during the period of anoestrus and during the period of reproduction. The treatment combination based on vaginal sponges impregnated by 20 mg of FGA during 11 days and intramuscular administration of 300 IU of eCG and 50  $\mu$ g of cloprostenol 48 hours before sponge removal appears as the best compromise between efficiency and hormone dose reduction;

- 4) The use of the buck effect in order to induce and to synchronize oestrus and ovulation in Beni Arouss goats treated with 20 mg of FGA and 50 µg of cloprostenol appears as an interesting alternative to f eCG during the reproduction period.

As these study results have been generated throughout controlled research settings, their validity needs to be verified under field conditions. Later on, these results might implement the practices of the insemination center whose creation is planned as next step of a development and cooperation project.



## Remerciements

Parce qu'arriver au bout d'un doctorat c'est avant tout être entouré de personnes intelligentes, enthousiastes et patientes, j'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui m'ont formée, assistée, aidée, soutenue et motivée.

Je remercie tout d'abord mes promoteurs, de même que tous les membres de mon Comité de thèse pour leur accompagnement tout au long de mes recherches.

Au Professeur Nathalie Kirschvink, promotrice de cette thèse pour avoir cru en moi malgré les difficultés rencontrées. Professeur, votre rigueur scientifique a permis d'atteindre les objectifs assignés à cette thèse. Votre patience, vos sages conseils et votre attention toute particulière m'ont particulièrement touché, les mots me manquent pour en dire plus, alors simplement merci.

Je tiens à rendre un hommage particulier au Docteur Mouad Chentouf pour avoir accepté de promouvoir et encadrer cette thèse. Vous m'avez enseigné à l'ENA mais avez aussi encadré ma thèse. Quelle chance ! Docteur, votre engagement dans les activités de terrain et vos qualités humaines m'ont particulièrement émue. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

J'adresse ma profonde gratitude au Professeur Tawfiq Benziane, Directeur de l'Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès, pour les facilités qu'il a bien voulu m'accorder pour bien mener à terme cette thèse.

Mes sincères remerciements vont également à ma très chère Marianne Raes et au Professeur Jean-Loup Bister pour leurs qualités humaines exemplaires et leur pleine implication aussi bien dans les activités de terrain que dans la rédaction des articles. Vous avez toujours répondu avec promptitude à toutes mes sollicitations. Je vous prie d'accepter l'expression de mes sincères remerciements.

J'exprime mes très vifs remerciements au Professeur Jean-François Beckers et au Professeur Bouchaib Archia, membres de mon comité de thèse pour leurs contributions scientifiques à la réussite de ce travail mais aussi pour leurs sages conseils et leurs encouragements.

Je remercie également les membres du jury : Professeur Jean-Michel Vandeweerdt, Professeur Isabelle Donnay et Dr. Francisco Arrebola qui, malgré leurs occupations multiples, m'ont honoré en acceptant d'évaluer cette thèse.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à tout le personnel et stagiaires de l'INRA pour leur franche collaboration. Ce travail a été rendu possible grâce à eux.

Je remercie également les ouvriers du domaine expérimental de Bougdour qui ont fait preuve d'une bonne volonté et d'un dynamisme à toute épreuve pour mener toutes les expérimentations dans les meilleures conditions.

Qu'il me soit permis d'exprimer toute ma gratitude à l'ensemble du personnel d'URVI du Département de Médecine vétérinaire à l'Université de Namur, avec lequel j'ai passé des moments inoubliables.

Cette thèse a été réalisée grâce à l'appui financier de l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES) et dont je tiens à remercier particulièrement les différents gestionnaires.

Je remercie mes collègues du Département de Productions Animales et Pastoralisme pour leur soutien, qu'ils trouveront ici l'expression de ma profonde gratitude.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à ma très chère Dr. Bouchra El Amiri pour ses sages conseils ainsi que pour ses encouragements.

Toute ma reconnaissance à l'égard de ma famille pour le soutien moral et affectif. Je dédie cette thèse à mes parents qui représentent tout pour moi, à mon mari pour sa patience et son soutien inestimable, à mes frères, à ma sœur et amis.

A mon petit bébé qui a vu le jour vers la fin de la thèse ! La préparation à ton arrivée a été un véritable booster au quotidien.

# Table des matières

▪ Résumé	1
▪ Abstract	4
▪ Remerciements	7
▪ Table des matières	9
▪ Liste des abréviations	11
▪ Contexte général	13
▪ Chapitre I. Revue de littérature	14
1. La reproduction chez le bouc	17
1.1. La saisonnalité de la reproduction chez le bouc	17
1.1.1. Aspects neuroendocrinologiques	18
1.1.2. Aspects comportementaux : La libido	20
1.1.3. Variation de la taille testiculaire en fonction de la saison	21
1.1.4. Variation de la quantité et la qualité de la semence en fonction de la saison	21
1.2. Conservation de la semence caprine	23
1.2.1. Prélèvement de la semence	23
1.2.2. Caractéristiques du sperme chez le bouc : effet délétère du plasma séminal	23
1.2.3. Composition du dilueur	24
1.2.3.1. Cryoprotecteurs perméants	25
1.2.3.2. Cryoprotecteurs non perméants	26
1.2.3.3. Substrats énergétiques	26
1.2.3.4. Tampons	26
1.2.3.5. Sels	27
1.2.3.6. Antibiotiques	27
1.2.4. Température de conservation	27
1.2.5. Facteurs de variation de la qualité de la semence conservée	28
1.2.5.1. Dilueur utilisé	34
1.2.5.2. Température de conservation	35
1.2.5.3. Utilisation d'antioxydants	36
1.2.5.4. Saison de l'année	37
2. La maîtrise de la reproduction chez la chèvre	30
2.1. Activité saisonnière des chèvres	30
2.1.1. Cycle œstral en saison sexuelle	31
2.1.2. Activité sexuelle en anœstrus saisonnier	34
2.2. Utilisation des traitements hormonaux pour l'induction et la synchronisation d'œstrus chez la chèvre	34
2.2.1. L'Acétate de Fluorogestone et son efficacité pour la maîtrise de la reproduction caprine	34
2.2.2. Facteurs influençant la réponse au traitement	35
a. Concentration de la progestérone	35
b. Durée de maintien d'éponge	36
c. Injection de l'eCG en combinaison avec la FGA	36
d. Injection de la PGF en combinaison avec la FGA	38
2.3. Utilisation de l'effet bouc pour l'induction et la synchronisation d'œstrus chez la chèvre	38
2.3.1. Description de l'effet bouc	38
2.3.2. Mécanismes impliqués	39
2.3.3. Principaux facteurs de variation	40
a. Profondeur de l'anœstrus	40
b. Intensité de stimulation	41

c. Séparation préalable entre les sexes et durée de contact	41
d. Saisonnalité et race	42
2.3.4. Le traitement photopériodique des boucs	42
2.3.5. Traitements hormonaux combinés à l'effet bouc	43
▪ Chapitre II. Objectifs, matériel et méthodes	45
1. Objectifs de la recherche	46
2. Matériel et méthodes	47
2.1. Zone d'étude	47
2.2. Animaux et conduite alimentaire	48
2.3. Protocole expérimental	48
2.4. Les principales techniques utilisées en complément des méthodes dites « classiques »	49
Analyse du sperme assistée par ordinateur (CASA)	50
La méthode immuno-enzymatique (ELISA)	51
▪ Chapitre III. Présentation des études (sous forme d'articles)	52
□ Etude 1. Variation saisonnière de l'activité de la reproduction chez les boucs Beni Arouss	53
<b>Effect of season on sexual behaviour, testicular measurements and seminal characteristics in "Beni Arouss" North Moroccan bucks (published)</b>	<b>54</b>
□ Etude 2. Influence de la saison sur l'aptitude de conservation à l'état liquide de la semence du bouc Beni Arouss	76
<b>Influence of season and liquid storage at 16° C on Beni Arouss buck semen (submitted)</b>	<b>77</b>
□ Etude 3. Mise au point des protocoles classiques d'induction et de synchronisation d'œstrus et d'ovulation chez la chèvre Beni Arouss	91
<b>Evaluation of different hormonal treatments on oestral and ovarian responses in Beni Arouss goats during the anoestrus and breeding seasons (revised version submitted)</b>	<b>92</b>
□ Etude 4. Mise au point d'un protocole alternatif d'induction et de synchronisation d'ovulation chez la chèvre Beni Arouss	105
<b>Response to the sexually active buck effect in Beni Arouss goats primed with progestagens during the anoestrus and breeding seasons (under preparation)</b>	<b>106</b>
▪ Chapitre IV. Discussion générale, conclusions et perspectives	120
□ Discussion générale	121
□ Conclusions et perspectives	128
▪ Références bibliographiques	131

## Liste des abréviations

°C	:	Degré celsius
°N	:	Degré nord
°O	:	Degré ouest
µg	:	Microgramme
µl	:	Microlitre
µm	:	Micromètre
ABP	:	Androgen binding protein
ADN	:	Acide Désoxyribo Nucléique
AI	:	Artificial insemination
ANOC	:	Association Nationale Ovine et Caprine
ANOVA	:	Analyse de la variance
Anti-eCG	:	Anticorps eCG
ARES	:	Académie de recherche et d'enseignement supérieur
ATP	:	Adénosine triphosphate
Ca Na <sub>2</sub>	:	Calcium disodium
CASA	:	Computer Assisted Sperm Analysis
CAT	:	Catalase
CIDR	:	Controlled internal drug releasing
CRRAT	:	Centre Régional de la Recherche Agronomique de Tanger
CS	:	Circonférence scrotale
DRO	:	Dérives réactifs à l'oxygène
eCG	:	Equine chorionic gonadotropin
EDTA	:	Éthylène-Diamine-Tétra-Acétique
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
EYCE	:	Egg yolk coagulating enzyme
FAO	:	Food and Agriculture Organization
FB-	:	Feedback négatif
FB+	:	Feedback positif
FGA	:	Acétate de fluorogestone
FSH	:	Hormone folliculostimuline
GnRH	:	Gonadotropin releasing hormone
GPx	:	Glutathione peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Peroxyde d'hydrogène
IA	:	Insémination artificielle
INRA	:	Institut National de la Recherche Agronomique
JC	:	Jours courts
JL	:	Jours longs
KDa	:	Kilodalton
LH	:	Hormone lutéinisante
LW	:	Live weight
MAP	:	Acétate de médroxyprogestérone
MAPM	:	Ministère d'Agriculture et de la Pêche Maritime
MDA	:	Malondialdéhyde
mg	:	Milligramme
ml	:	Millilitre
mm	:	Millimètre
mOsm	:	Milliosmole

MP	:	Motilité progressive
MT	:	Motilité totale
NARILIS	:	Namur Research Institute for Life Sciences
ng	:	Nanogramme
NO	:	Oxide nitrique
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	:	Anion superoxide
P	:	Probabilité
PAR	:	Plan Agricole Régional
PGF2alpha:	:	Prostaglandin F2alpha
PM	:	Progressive motility
PMSG	:	Pregnant mare's serum gonadotrophin
PPCN	:	Phosphocaséinate natif
r	:	Coefficient de corrélation
RAPID	:	Rapid spermatozoa
RFRP	:	RFamide-related peptide
SAS	:	Statistical Analysis Software
SC	:	Scrotal circumference
SD	:	Standard deviation
SOD	:	Superoxide dismutase
TD	:	Testicular diameter
TL	:	Testicular length
TM	:	Total motility
UI	:	Unité internationale
VAP	:	Average Path Velocity
VCL	:	Curvilinear Velocity
Vs	:	Versus
VSL	:	Straight-Line Velocity

*Contexte général*

## Contexte général

Dans les pays du bassin méditerranéen, l'élevage des ovins et caprins a été et restera une production typique liée aux traditions de la région. Il a toujours été une des principales productions animales dans ces pays (Boyazoglu et Hatziminaoglou, 2002) et permet une valorisation efficace de milliers d'hectares marginaux en permettant une production de protéines animales de haute qualité (Boyazoglu et Flamant, 1990).

Au Maroc, l'élevage caprin compte un effectif important : 6,1 Millions de têtes réparties dans les régions montagneuses et enclavées (MAPM, 2017). Le système d'élevage le plus répandu est le système extensif basé notamment sur l'utilisation des parcours et des forêts. La production nationale en viande rouge caprine est de 29.817 tonnes par an, soit 6% de la production nationale en viandes rouges alors que celle en lait est de 44 millions de litres, soit 2% de la production nationale en lait (FAOSTAT, 2016). C'est un élevage notamment orienté vers la production de viande avec une productivité faible estimée à 6 kg de viande et 38 kg de lait par chèvre et par an (Benlkhal et Tazi, 2005). Malgré ceci, ce type d'élevage reste au centre des dynamiques de développement des sociétés rurales et joue par conséquent un rôle dans la constitution des revenus des éleveurs notamment ceux des régions marginalisées.

Dans la région Nord du Maroc, l'élevage caprin compte un effectif de 788.000 têtes, soit 10% du cheptel caprin national et 37% du cheptel de la région (Chentouf et al., 2014). Deux systèmes d'élevages caprins se côtoient dans la région, l'élevage destiné à la production de viande uniquement, qui domine le secteur, et celui organisé pour une production mixte, lait et viande (Chentouf et al. 2004 ; Alami et al., 2005). La production en viande caprine de la région est estimée à 5000 tonnes de viande par an et celle de lait est de 400 tonnes de lait par an (Jout, 2014).

Malgré sa faible productivité (Chentouf et al., 2006 ; 2009), l'élevage caprin apporte une forte contribution aux revenus des populations rurales du Nord du Maroc (estimée à 70%, Chentouf et al., 2011) et joue par conséquent un rôle socio-économique incontestable.

Depuis le début des années 90, le secteur caprin bénéficie d'un appui des autorités publiques et d'organisations non gouvernementales. Dans la région du Nord du Maroc, cet appui se concrétise principalement dans le Programme Agricole Régional (PAR), retenu dans le cadre du plan "Maroc vert" horizon 2020. Ce plan vise l'amélioration de la rentabilité des élevages et par conséquent du niveau de vie des producteurs caprins. Pour atteindre cet objectif, la mise en place d'un programme d'amélioration génétique des caprins locaux est retenue comme axe d'intervention prioritaire.

Notre recherche s'inscrit dans cette perspective. En effet, la race Beni Arouss reconnue récemment comme la race locale de la région du Nord du Maroc (N° 6430, 01/2016, Journal officiel du royaume du Maroc) fait l'objet de ce programme d'amélioration génétique. Cette race, malgré la grande variabilité qui existe entre les individus, est caractérisée par une bonne adaptation aux milieux difficiles ainsi que des bons potentiels de production en viande et en lait qui s'améliorent en passant d'un système extensif à intensif (Chentouf, 2007).

Une sélection bien structurée de la race Beni Arouss va permettre d'améliorer la productivité des élevages de façon à réduire également l'introduction de ressources génétiques exogènes. Bien que productive, les races introduites (telles que les races Alpine, Murciano-Granadina et Saanen) ne s'adaptent que faiblement aux systèmes des petits éleveurs et mettent le maintien et le développement des races locales en péril.



Depuis la reconnaissance officielle de la race Beni Arouss, un programme de sélection génétique a été mis en place. Il est piloté par l'Association Nationale Ovine et Caprine (ANOC) au Maroc et en est à ses premiers stades d'application.

L'objectif global de la présente thèse est de mettre au point les savoirs techniques nécessaires à l'implantation et au fonctionnement d'un centre d'insémination artificielle (IA) qui va accompagner le programme d'amélioration génétique de la race Beni Arouss.

En effet, l'application de l'IA nécessite une étude préalable de la variation saisonnière de l'activité de reproduction chez les boucs. Concernant la race Beni Arouss, peu d'informations existent. La seule étude réalisée a concerné toute la population du Nord du Maroc et a été limitée aux mensurations testiculaires avec quelques paramètres de qualité spermatique (Chentouf et al., 2011). Ainsi, un suivi mensuel et pendant toute l'année de la variation du comportement sexuel, des mensurations testiculaires et de la quantité et la qualité spermatique, va permettre de déterminer la meilleure période pour la réalisation de la collecte de semence en vue d'inséminations artificielles.

Durant ces dernières années, la conservation de la semence à l'état liquide est devenue une technique courante et peu coûteuse pour développer l'insémination artificielle à grande échelle chez les chèvres (Leboeuf et al., 2000 ; 2003). Seulement, la capacité du sperme conservé à maintenir sa qualité plus longtemps est essentielle pour offrir une plus grande flexibilité entre les élevages et le centre d'IA. L'influence de la saison sur la cryoconservation de la semence chez le bélier et le bouc a été étudiée chez plusieurs races (Tuli et Holtz., 1995 ; D'Alessandro et Martemucci, 2003 ; Gallego-Calvo et al., 2015 ; Wang et al., 2015). Toutefois, aucune étude de l'influence de la saison sur la conservation à l'état liquide du sperme du bouc Beni Arouss n'a été réalisée. Pour ceci, un suivi mensuel et pendant toute l'année de la variation saisonnière de la qualité de la semence conservée à 16°C va permettre d'évaluer l'aptitude de conservation de la semence en fonction de la saison.

Par ailleurs, les protocoles hormonaux d'induction et de synchronisation des ovulations adaptés aux chèvres Beni Arouss ne sont pas disponibles. Ni la dose optimale du traitement progestagène, ni la dose d'eCG ou de prostaglandines 2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) à appliquer ne sont connues, ce qui explique la faiblesse des résultats obtenus à l'heure actuelle. La mise au point de protocoles adaptés s'avère donc nécessaire.

Finalement, la mise au point d'un protocole alternatif basé sur une utilisation limitée d'hormones exogènes, en remplaçant l'eCG par l'effet bouc est à prospecter, surtout après l'évolution récente des préoccupations sociétales vers le renforcement de la sécurité alimentaire des produits animaux à travers une réduction des résidus ainsi que vers la promotion du bien-être animal. En plus, une apparition des anticorps anti-eCG est observée lors des utilisations répétées des traitements hormonaux avec l'eCG (Baril et al., 1996 ; Roy et al., 1999), réduisant par conséquent l'utilisation prolongée de cette hormone.

Ce document de thèse est présenté en quatre grands chapitres. Le premier chapitre fait le point sur les connaissances relatives à la saisonnalité et à la conservation de la semence chez le bouc et à la maîtrise de la reproduction chez la chèvre. Le deuxième est consacré aux objectifs détaillés de la recherche et à la présentation de la zone d'étude et des principales méthodes et matériel utilisés. La troisième partie présente quatre études réalisées sous forme d'articles originaux. La dernière partie consistera en une discussion générale menant aux conclusions et ouvrant les perspectives au terme de cette recherche doctorale.

## ***Chapitre I. Revue de la littérature***

## ▪ Chapitre I. Revue de la littérature

### 1. La reproduction chez le bouc

#### 1.1. La saisonnalité de la reproduction chez le bouc

L'activité reproductrice de la plupart des petits ruminants présente des variations saisonnières. Ces variations se manifestent chez la femelle par l'existence d'une période d'anœstrus saisonnier (repos sexuel) et d'une période de reproduction sexuelle ; Tandis que chez le mâle, une période de faible activité sexuelle existe et elle est caractérisée par une diminution de l'intensité du comportement sexuel (libido), de la taille testiculaire, de la sécrétion hormonale et de la production de la semence aussi bien en quantité qu'en qualité.

Dans les élevages, la saisonnalité de la reproduction engendre des baisses plus ou moins importantes de la fertilité (Thimonier, 1996; Chemineau et al., 1998). Chez le bouc, elle est plus ou moins marquée selon plusieurs facteurs à savoir la race (Perez and Mateas, 1996; Karagiannidis et al., 2000; Ángel-García et al., 2015; Arrebola and Abecia, 2017), le climat (Zarei et al., 2009), la saison (Roca et al., 1992; Karagiannidis et al., 2000; Barkawi et al., 2006; Talebi et al., 2009; Zarazaga et al., 2009; Arrebola and Abecia, 2017), l'alimentation (Walkden-Brown et al., 1994; Martin and Walkden-Brown, 1995; Walkden-Brown and Bocquier, 2000; Martin et al., 2004; Blache et al., 2008; Dolatpanah et al., 2008; Martin et al., 2010; Vázquez-Armijo et al., 2011; Adibmoradi et al., 2012) et la latitude (Perez and Mateas, 1996; Karagiannidis et al., 2000; Choe et al., 2006; Gómez-Brunet et al., 2012). Cependant, la saison est l'un des facteurs qui semblent avoir la plus grande influence sur les performances reproductives des boucs (Perez and Mateas, 1996; Barkawi et al., 2006).

Il a été clairement établi que la variation saisonnière de la fertilité chez les caprins est contrôlée principalement par les variations annuelles de la durée du jour (Chemineau et al., 1992a; Delgadillo et al., 2004; Talebi et al., 2009). Les variations annuelles de la photopériode sont traduites en rythme de sécrétion de la mélatonine. Chez les caprins considérés comme une espèce à jours courts, la réduction de la durée du jour (augmentation de la durée des nuits) entraîne une augmentation dans la durée de sécrétion de la mélatonine et dans sa concentration pendant l'obscurité, cette hormone sécrétée par la glande pinéale suivant un rythme nycthémeral est responsable de la traduction du message lumineux chez les animaux (Thibault and Levasseur, 2001; Cameron, 2008). En agissant sur l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire elle stimule la fonction de reproduction via le contrôle de la sécrétion pulsatile de GnRH / LH (Chemineau et al., 2010). Des études récentes ont montré que la mélatonine agissait sur les neurones à GnRH / LH à travers une population de neurones, appelée neurones à Kisspeptines et RFRP (RFamide-related peptide) (Clarke et al., 2009 ; Dardente et al., 2016). Chez les chèvres, la signalisation par les kisspeptines joue un rôle important dans la sécrétion pulsatile de la GnRH et de la LH afin de contrôler la saison de reproduction chez cette espèce (Wakabayashi et al., 2010).

Par ailleurs, pour que la réduction de la durée de jour déclenche la saison de reproduction, il faut qu'elle ait été précédée d'un allongement du jour.

### 1.1.1. Aspects neuroendocrinologiques

Chez le mâle, le démarrage de la spermatogenèse s'effectue à la puberté et se caractérise par l'augmentation du volume testiculaire suite à l'augmentation de la longueur et du diamètre des tubules et la formation de la lumière dans ces derniers.

Le développement des spermatogonies, disposées en périphérie de l'épithélium séminal et entre les cellules de Sertoli, en spermatozoïdes est organisé selon un ordre spatial et temporel rigoureux ; l'entrée en spermatogenèse (Fig. 1) de différents ilots de spermatogonies se fait en effet de façon régulière et cyclique tous les 10 jours chez le bouc (França et al., 1999). Un cycle complet dure par ailleurs 51 jours et implique trois divisions successives de spermatogonies en spermatocytes de 1<sup>er</sup> (phase de spermatocytogenèse) puis de 2<sup>ème</sup> ordre et enfin en spermatides (phase de méiose) qui vont se différencier après 37 jours à peu près en des spermatozoïdes libres (spermiogenèse) en se détachant du compartiment apical des cellules de Sertoli (Derashri et al., 1992 ; França et al., 1999 ; Gilles et al., 2006). Ces différentes phases sont sous contrôle de l'axe gonadotrope. La gonadolibérine, GnRH, de l'hypothalamus contrôle la sécrétion de deux gonadotrophines hypophysaires, la LH et la FSH. Celles-ci ne sont pas seulement impliquées dans la différenciation et la multiplication des cellules souches, mais aussi dans la synthèse et la sécrétion de la testostérone par les cellules Leydig du testicule (Chemineau and Delgadillo, 1994) (Fig. 2).

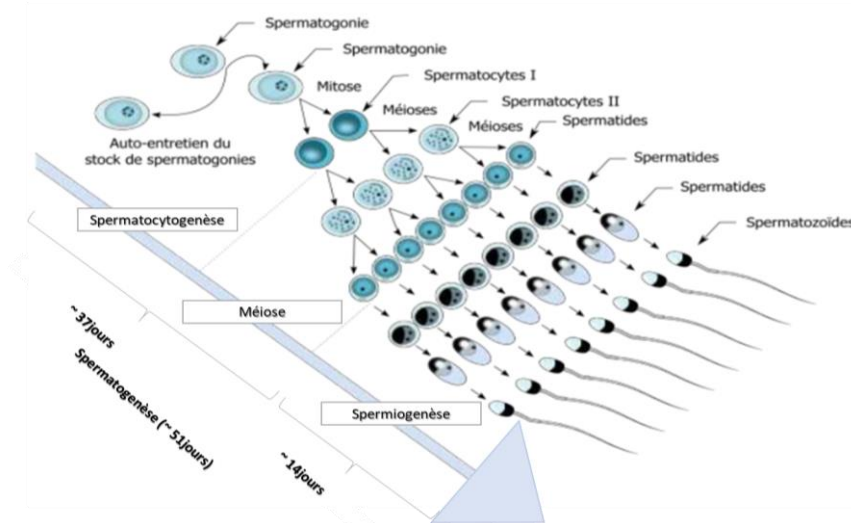


Figure 1. Schéma récapitulatif des différentes phases de la spermatogenèse chez le bouc.

En fait, la régulation de la sécrétion de FSH est faite d'une manière moins épisodique (Chemineau et Delgadillo, 1994). C'est l'hormone qui agit directement sur les cellules germinales en activant leur multiplication et qui stimule la production de l'ABP (Androgène Binding Protein) et l'inhibine par les tubules séminifères et les cellules de Sertoli. Cette dernière exerce un feed-back négatif sur la sécrétion de FSH en agissant soit sur les neurones hypothalamiques, soit sur les noyaux hypophysaires (de Kretser et al., 2000).

Pour la LH, elle n'est pas libérée continuellement par l'hypophyse. Des périodes brusques de libération contrôlées par l'activité des neurones de l'hypothalamus, ont lieu en alternance avec

des périodes de repos au cours desquelles une sécrétion basale est enregistrée. Ces périodes de sécrétion, appelées pulses, se caractérisent par leur amplitude, directement liée à la quantité de la LH libérée dans la circulation générale.

Les changements brutaux de la concentration plasmatique de LH agissent indirectement sur le processus de la spermatogenèse en entraînant une stimulation rapide des cellules de Leydig qui réagissent en synthétisant de la testostérone. Celle-ci se lie au niveau du cytoplasme sertolien à l'ABP dont le complexe ainsi formé agit sur les spermatocytes en activant la méiose et sur les spermatides en stimulant la spermiogenèse. Par ailleurs, la testostérone circulante stimule le tractus génital, les caractères sexuels secondaires, le comportement sexuel et les glandes annexes, d'une part, et inhibe par rétroaction négative la sécrétion de LH, d'autre part (Fig. 2).

D'avantage, chez le mâle, des concentrations élevées d'œstrogènes sont détectées dans les testicules en plus de la testostérone produite par les cellules de Leydig. La production d'œstrogènes provient de la conversion enzymatique d'androgènes en œstrogènes par l'enzyme aromatasase, et les cellules de Leydig sont plus actives dans la production d'œstrogènes que les cellules de Sertoli (O'Donnell et al., 2001). En effet, il est possible qu'une partie de l'action inhibitrice de la testostérone s'exerce au travers de sa bioconversion en œstradiol. Ce dernier ralentit aussi le générateur de pulses hypothalamiques et donc la libération de LH (Stormshak et al., 2008 ; Roser, 2011).

Chez le mâle, chaque pulse de LH est suivi d'un pulse de testostérone dont l'amplitude varie en fonction de la situation physiologique de l'individu (Chemineau and Delgadillo, 1994) (Fig. 3).

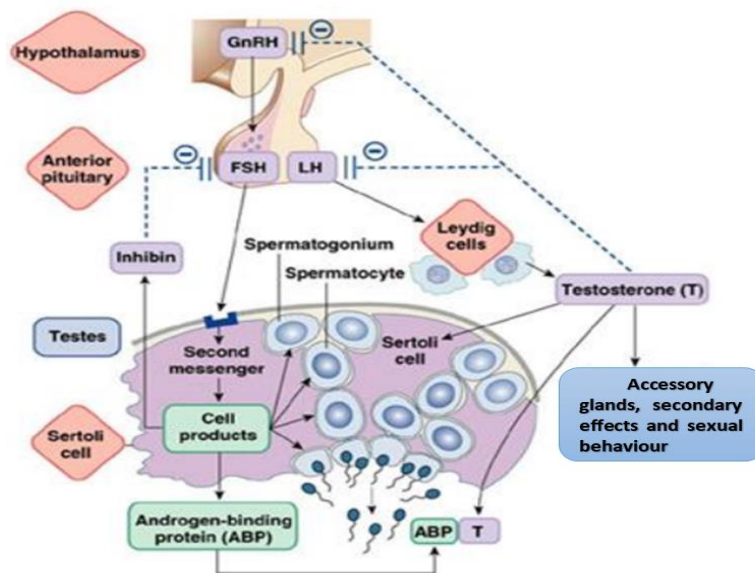


Figure 2. La régulation hormonale de la fonction sexuelle chez le mâle (Copyright © 2007. Pearson Education, Inc. publishing as Benjamin Cummings).

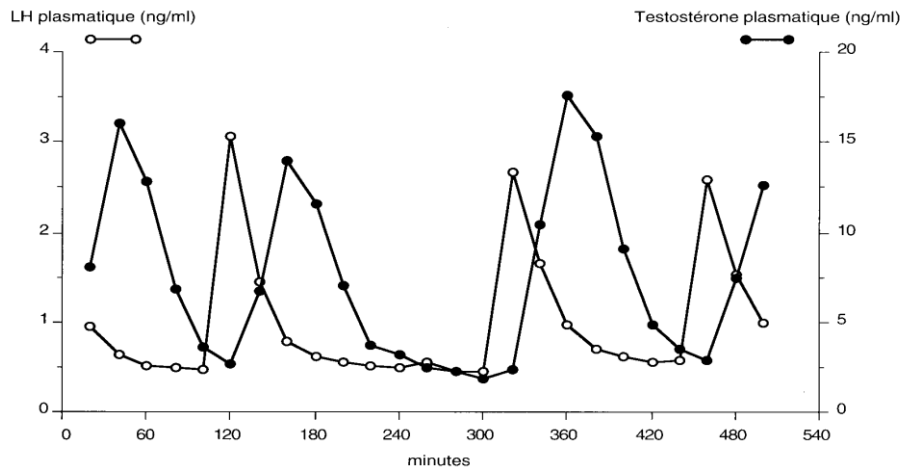


Figure 3. Variations des concentrations plasmatiques en LH et en testostérone chez le bouc de race Créole lorsque des prélèvements sanguins ont été effectués toutes les 20 min (Chemineau et Delgadillo, 1994).

L'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire chez les caprins est saisonnière. La sécrétion de la testostérone par les testicules dépend principalement de la latitude (Delgadillo et al., 2004). Elle est étroitement liée aux variations de la durée des jours de façon que les jours courts ou décroissants stimulent la sécrétion de la LH, qui à son tour induit une croissance testiculaire et la libération de la testostérone. Au contraire, les jours croissants, favorisent une diminution de la sécrétion de la LH, une involution des testicules et une réduction de la libération de la testostérone (Walkden-Brown et al., 1994 ; Hotzel et al., 2003).

#### 1.1.2. Aspects comportementaux: la libido

La saisonnalité de la reproduction est un phénomène influencé principalement par les variations annuelles de la photopériode et dont l'intensité augmente relativement à la latitude (Abecia et al., 2012).

Le comportement sexuel est considéré parmi les premiers changements observés lors des variations de saison. Dans les zones tempérées, les boucs connaissent une reproduction saisonnière marquée. Par exemple, chez le bouc de la race Alpine et Saanen maintenus à 46°N de latitude, la diminution de la durée du jour en automne est accompagnée par une augmentation de la concentration de la testostérone avec des changements observés dans la libido (Delgadillo and Chemineau, 1992; Chemineau et al., 1999). La proportion des boucs n'ayant pas éjaculé augmente entre Mai et Août, alors qu'à partir d'Octobre à Avril tous les boucs éjaculent (Delgadillo et al., 1991). Le temps de réaction (temps entre le premier contact avec la femelle et l'éjaculation chez le bouc) change aussi d'une saison à une autre (Delgadillo et al., 1991) et il est inversement lié au niveau de la testostérone dans le sang (Delgadillo et al., 2001).

Cependant, dans les zones de latitude moyenne (30-40°N) et principalement dans la région méditerranéenne et le Moyen Orient, la plupart des races dont la race Payoya (Zarazaga et al., 2009), la race Murciana granadina (Arrebola et al., 2010) et la race Zaraibi (Barkawi et al., 2006) ont montré une activité reproductive moins saisonnière avec un maximum d'activité sexuelle (temps minimal de réaction) observé durant les saisons estivale et automnale. D'autres

races à savoir la race Blanche d'Andalousie (Gallego-Calvo et al., 2015) et la race Verata (Perez and Mateas, 1996) n'ont pas montré de variations significatives dans le comportement sexuel par rapport à d'autres paramètres.

Plus loin, dans les zones où la latitude est inférieure à 30°N, la saisonnalité est quasi absente (Greyling and Grobbelaar, 1983; Chemineau, 1986).

#### 1.1.3. Variation de la taille testiculaire en fonction de la saison

Les variations saisonnières de la taille testiculaire représentent un autre effet physiologique de la saison chez le bouc. Il s'agit de paramètres physiques rapidement mesurables. La circonférence scrotale (CS) est l'élément le plus fréquemment mesuré dans les études sur les variations saisonnières de l'activité sexuelle chez les boucs, car il s'agit d'une mesure facile à obtenir en utilisant un ruban métrique conçu pour cette raison. En plus, la circonférence scrotale peut être considérée comme facteur prédictif de la fonction spermatogénique du mâle (Daudu, 1984) et a été utilisée pour prédire la production spermatique chez le bouc (Ritar et al., 1992; Walkden-Brown et al., 1994; Turri et al., 2016).

Chez les boucs de différentes races européennes, sous des latitudes élevées, le volume testiculaire varie au cours de l'année principalement sous l'influence de la photopériode (Corteel, 1977; Leboeuf et al., 2000). La taille testiculaire est maximale en saison sexuelle et diminue en dehors de celle-ci (Delgadillo et al., 1991). En revanche, sous faibles latitudes, chez les boucs de la race Créole (26° N) ou la race locale Canarienne (28°N) on n'observe peu ou pas de variations saisonnières de ces paramètres (Chemineau, 1986; Fresno et al., 2000).

Dans les zones de latitude moyenne, Al-Ghalban et al. (2004), Kridli et al. (2007), Zarazaga et al. (2009) et Chentouf et al. (2011) ont également illustré la variation saisonnière de la taille testiculaire sur une année complète respectivement chez des boucs des races Damascus, Noire locale de Damascus, Payoya et la population locale du Nord du Maroc. Pour la plupart, les valeurs maximales ont été obtenues en été et en automne alors que, les valeurs minimales ont été obtenues en hiver. La saison de l'année n'a pas influencé la taille testiculaire chez les races Blanche d'Andalousie et Murciana granadina (Gallego-Calvo et al., 2015; Arrebola and Abecia 2017).

#### 1.1.4. Variation de la quantité et la qualité de la semence en fonction de la saison

À l'instar de la libido et de la taille testiculaire, la production spermatique ainsi que la qualité de la semence sont également influencées par la photopériode. Dans les zones tempérées, la spermatogenèse ne s'arrête pas mais la production spermatique diminue à certaines périodes de l'année à cause de la diminution du rendement de la spermatogenèse (Colas et al., 1972 ). Chez les races à activité saisonnière dont les races Alpine et Poitevine, le volume, la concentration de la semence et le nombre total des spermatozoïdes par éjaculat varient avec les saisons. Un volume élevé est obtenu durant la saison sexuelle (en automne et hiver) et qui diminue au printemps pour atteindre son minimum pendant la saison estivale. La concentration spermatique suit une évolution inverse de celle du volume et du nombre total des spermatozoïdes et elle est faible en saison sexuelle et élevée en dehors de la saison de reproduction. Ces variations sont dues aux changements observés dans la sécrétion du plasma séminal par les glandes annexes. Celles-ci sont stimulées par la testostérone dont la concentration est élevée en saison sexuelle et basse en contre saison (Corteel, 1977).

La qualité des spermatozoïdes est aussi affectée par la saison. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et leur motilité massale sont plus élevés durant la saison sexuelle (automne et hiver). En dehors de celle-ci (printemps et été) la motilité du sperme diminue progressivement pour atteindre des niveaux faibles pendant plusieurs semaines (Corteel and baril, 1975; Corteel et al., 1976; Delgadillo et al., 1992).

De faibles variations du pourcentage d'anomalies morphologiques ont été mises en évidence avec un niveau de 5-8% durant la saison sexuelle et 10-18% en dehors de celle-ci (Corteel, 1977; Tuli and Holtz, 1992). Cependant, le changement saisonnier observé dans la motilité des spermatozoïdes est associé à une diminution de la fertilité. Quand des chèvres Alpines ont été inséminées avec des spermatozoïdes produits en dehors de la saison sexuelle, les taux de fertilité obtenus ont été faibles (Corteel et al., 1976).

Sous faibles latitudes, Chemineau (1986) a rapporté que les boucs de la race Créole de Guadeloupe (26° N), ne manifestent pas de variations saisonnières dans leur activité sexuelle s'ils sont soumis à des bonnes conditions d'élevage. Le volume, la concentration de l'éjaculat et le nombre total des spermatozoïdes restent stables durant tous les mois de l'année. De même, la fertilité ne varie pas quelle que soit la saison d'accouplement.

Dans la région méditerranéenne, plusieurs races dont les races Murciana granadina, Verata, Payoya, population locale du Nord du Maroc et la Blanche d'Andalousie ont été étudiées afin d'observer les variations saisonnières de la quantité et de la qualité de la semence (Roca et al., 1992; Perez and Mateas, 1996; Zarazaga et al., 2009; Chentouf et al., 2011; Gallego-Calvo et al., 2015). La récolte de la semence a été effectuée à l'aide d'un vagin artificiel dans toutes les études. Chez la race Murciana granadina, la saison a affecté la quantité de la semence récoltée, le volume et le nombre total de spermatozoïdes les plus élevés ont été obtenus en été et en automne comparativement à l'hiver et au printemps. La concentration suit une évolution inverse. Le pourcentage des spermatozoïdes normaux et la motilité étaient plus élevés en été et en automne ce qui montre qu'une bonne quantité et qualité de la semence ont été obtenues durant ces deux saisons. Cependant, la race Verata présentait une concentration et un volume spermatique élevés en hiver et printemps et les faibles valeurs étaient donc observées en été et en automne. Les auteurs ont également noté des différences significatives entre les saisons pour les critères de la qualité de la semence, les valeurs les plus élevées ont été obtenues en été et en automne et qui diminuent en printemps (Perez and Mateas, 1996).

Pour les races Payoya et Blanche d'Andalousie, Zarazaga et al. (2009) et Gallego-Calvo et al. (2015) ont également noté des différences significatives entre les saisons pour la plupart des critères d'évaluation de la semence, avec des faibles valeurs de concentration et de motilité obtenues en hiver.

Enfin, tout comme chez les races espagnoles, Chentouf et al. (2011), avec des boucs de la population locale du Nord du Maroc, ont trouvé que les valeurs inférieures concernant la production de la semence ont été obtenues pendant la saison hivernale, tandis que la motilité et la viabilité ne variaient pas selon la saison de l'année.

En conclusion, sous des latitudes moyennes, la majorité des auteurs s'accorde pour dire que les paramètres descriptifs de la qualité de la semence de bouc présentent des variations saisonnières. Cependant, certains affirment que ces variations ne sont toutefois pas assez importantes pour empêcher l'utilisation de la semence de bouc tout au long de l'année (Roca et



al., 1992; Perez and Mateas, 1996). Aussi, les variations individuelles semblent très importantes et à considérer.

## **1.2. Conservation de la semence caprine**

### **1.2.1. Prélèvement de la semence**

La semence de bouc est habituellement prélevée à l'aide d'un vagin artificiel ou par électroéjaculation. Bien que la première méthode nécessite l'entraînement des boucs à la collecte, la seconde peut s'effectuer sur des boucs inexpérimentés au prélèvement de la semence (Wulster-Radcliffe et al., 2001 ; Santiago-Moreno et al., 2009).

Des différences dans les caractéristiques des éjaculats obtenus par les deux méthodes ont été observées chez différentes espèces (Marco-Jiménez et al., 2005 ; 2008 ; Jiménez-Rabadán et al., 2012). L'électroéjaculation diffère de l'éjaculation naturelle de manière que les stimulations induites par l'électroéjaculation changent les fonctions sécrétrices des glandes annexes en affectant le volume de l'éjaculat obtenu (Alvarez et al., 2012). Un volume élevé avec une faible concentration est enregistré lorsque la semence est prélevée par électroéjaculation, ce qui entraîne une plus grande quantité du plasma séminal (Marco-Jiménez et al., 2008). En plus, des différences dans la composition du plasma ont été rapportées chez le bouc et le bélier lorsque la semence est prélevée par électroéjaculation, ce qui influence l'aptitude de la semence à la congélation (Marco-Jiménez et al., 2008, Alvarez et al., 2012). Après congélation-décongélation, la qualité de la semence prélevée à l'aide d'un vagin artificiel est meilleure que celle prélevée par électroéjaculation (Jiménez-Rabadán et al., 2012 ; 2016). Ceci, peut-être dû à un changement dans la composition et la concentration en protéines dans le plasma séminal en fonction de la méthode de collecte. Sachant que certaines protéines peuvent jouer un rôle important dans la prévention des dommages dus au choc thermique (Barrios et al., 2005), une modification dans leur proportion dans le plasma séminal peut donc influencer la cryorésistance de la semence. Par ailleurs, aucun effet de la méthode de prélèvement sur la qualité de la semence fraîche chez les petits ruminants n'a été enregistré (Marco-Jiménez et al., 2005 ; Álvarez et al., 2012, Jiménez-Rabadán et al., 2012).

On peut déduire que pour une conservation optimale du sperme, la collecte par vagin artificiel reste la plus recommandée pour obtenir un éjaculat de qualité. Pourtant, l'électroéjaculation reste une alternative pour la collecte de la semence chez les mâles non entraînés.

### **1.2.2. Caractéristiques du sperme chez le bouc : effet délétère du plasma séminal**

L'objectif de la conservation de la semence est de maintenir le pouvoir fécondant des spermatozoïdes tout en arrêtant ou réduisant leur mobilité et ainsi leurs réactions métaboliques pendant un certain temps (Evans and Maxwell, 1987). Pour cet effet, plusieurs dilueurs ont été utilisés afin d'assurer une conservation efficace de la semence et qui sont principalement à base du jaune d'œuf ou du lait.

Chez le bouc, un problème majeur provient de l'effet délétère du plasma séminal sur la survie des spermatozoïdes dilués et conservés dans des milieux à base du jaune d'œuf ou du lait. Cet effet a été attribué à une enzyme (phospholipase) appelée enzyme coagulatrice du jaune d'œuf (EYCE), sécrétée par les glandes bulbo-urétrales et libérée dans le plasma séminal sous influences saisonnières (Pellicer-Rubio et al., 1997; Upreti et al., 1999). Alors que pour le lait,

le problème est dû à une fraction protéique qui présente aussi une activité lipase appelée BUSgp60 (Leboeuf et al., 2000).

En contact avec le jaune d'œuf, l'EYCE du plasma séminal hydrolyse la lécithine du jaune d'œuf libérant des acides gras insaturés et la lysolécithine. Ce dernier composé peut être toxique pour les spermatozoïdes (Ritar and Salamon, 1991; Roca et al., 1997; La Falci et al., 2002) suivant plusieurs facteurs, à savoir la concentration dans le plasma séminal, le pH, la température et la saison de production de la semence. Il est rapporté selon le facteur responsable une détérioration de la motilité, de la qualité des mouvements, de l'intégrité acrosomiale ainsi que la mort cellulaire (Leboeuf et al., 2003b).

De façon similaire, la BUSgp60, hydrolyse les triglycérides du lait, libérant des acides gras dont l'acide oléique, un élément toxique pour les spermatozoïdes (Leboeuf et al., 2003b). L'effet catalytique de BUSgp60 est augmenté par l'interaction de cette lipase avec la lactoglobuline et la caséine (Leboeuf et al., 2000).

Chez les caprins, le plasma séminal produit hors saison de reproduction a un effet plus néfaste sur la motilité et la survie des spermatozoïdes que celui produit pendant la saison de reproduction (Leboeuf et al., 2000). En plus, il a été démontré que le retrait du plasma séminal par lavage augmente le pourcentage des spermatozoïdes vivants et leur mobilité lors de la dilution et la conservation dans des milieux à base du jaune d'œuf ou de lait (Ritar and Salamon, 1991; Chemineau et al., 1998). Cependant, le retrait du plasma séminal par centrifugation est une manipulation compliquée qui peut avoir un impact négatif sur la survie des spermatozoïdes (Cabrera et al., 2005) et il est probable que le nombre total des spermatozoïdes diminuera sensiblement après centrifugation suite à l'élimination de quelques spermatozoïdes avec le surnageant (Tuli and Holtz, 1994).

Certains auteurs sont toutefois persuadés que le plasma séminal reste primordial pour l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes et ils vont jusqu'à montrer que son retrait par lavage entraîne une baisse de la qualité spermatique chez le bouc (Azerêdo et al., 2001) ainsi qu'une baisse du taux de fertilité après insémination artificielle (Tummaruk et al., 2000).

Pour surmonter ces problèmes, les spermatozoïdes non lavés peuvent être conservés dans des milieux à base de tris et de 2% de jaune d'œuf (Ritar et al., 1990; Roca et al., 1997). De même, d'autres dilueurs alternatifs peuvent être utilisés pour réduire les interactions entre la lipase et les spermatozoïdes à savoir le lait écrémé, les dilueurs contenant de la caséine sans triglycérides ou du lait provenant d'autres espèces que la vache et dont la composition en acides gras et en triglycérides va être différente (Pellicer-Rubio and Combarnous, 1998). En plus, plusieurs dilueurs synthétiques dépourvus de jaune d'œuf et de lait sont disponibles actuellement sur le marché et ont été utilisés avec succès pour la conservation de la semence caprine (Roof et al., 2012; Vidal et al., 2013).

### 1.2.3. Composition du dilueur

Un dilueur est une solution aqueuse servant à augmenter le volume de l'éjaculat pour l'emmener à la concentration requise tout en préservant la fonctionnalité des spermatozoïdes pour maintenir la fertilité (Gadea, 2003).

En plus d'augmenter le volume, les dilueurs sont non seulement une source d'énergie pour les spermatozoïdes, mais ils protègent également contre la variation de la température tout en maintenant un environnement propice à la survie temporaire des spermatozoïdes (Gadea, 2003; Purdy, 2006).

Les composants des dilueurs ont été étudiés séparément et en combinaison avec l'accent mis sur la maximisation de la longévité, de la viabilité et de la capacité de fertilisation des spermatozoïdes (Purdy, 2006). Elle est variable suivant le type de conservation, frais ou congelé.

#### *1.2.3.1. Cryoprotecteurs perméants*

Les cryoprotecteurs ont comme rôle de protéger les spermatozoïdes des chocs thermiques dus au refroidissement, à la congélation et à la décongélation (Purdy, 2006).

En effet, on parle d'un choc thermique lorsqu'un changement rapide de température allant essentiellement de 35 à 15°C (refroidissement) et de 0 à -80°C (congélation) se produit (Bakhach et al., 2007). Au niveau du spermatozoïde, ces variations de température créent des changements au niveau des constituants lipidiques de la membrane plasmique et mènent à l'altération des fonctions métaboliques du spermatozoïde (Medeiros et al., 2002 ; Bakhach et al., 2007). Il s'ensuit une perte de motilité et de perméabilité sélective de la membrane plasmique au calcium (Medeiros et al., 2002). Lorsque la concentration intracellulaire en calcium est très élevée, la motilité, la viabilité et par conséquent la capacité fertilisante des spermatozoïdes sont réduites (Simpson et White, 1986 ; Collin et al., 2000). En effet, le degré de dommage structurel dépend de la température et de la constitution en lipides des membranes (Bailey et al., 2003).

La cryoconservation entraîne également, une augmentation de la sensibilité au stress oxydatif en raison d'une production augmentée des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) (Bucak et al., 2008). La congélation et la décongélation du sperme est associée à une augmentation de la production des DRO et à une diminution du taux en antioxydants ce qui peut endommager et réduire l'activité métabolique du spermatozoïde, entraînant une perte dans sa fonction.

Comme leurs noms indiquent, les cryoprotecteurs perméants sont essentiellement des solutés qui réduisent la cristallisation de l'eau à l'intérieur des cellules en provoquant la déshydratation, réduisant ainsi la formation de glace intracellulaire qui pourrait abimer les spermatozoïdes pendant la congélation (Purdy, 2006). Les cryoprotecteurs perméants sont généralement utilisés à des concentrations de 1 à 8 % (Purdy, 2006).

Le glycérol est le cryoprotecteur pénétrant le plus utilisé pour la semence de bouc et peut être ajouté à différents moments du processus de congélation (Purdy, 2006). À une concentration de 0,5 M, le glycérol contribue au changement de la structure des lipides membranaires du spermatozoïde, ce qui lui procure une stabilité et une perméabilité à l'eau (Holt, 2000). Le glycérol n'est pas nocif pour la semence et les spermatozoïdes de bouc sont peu sensibles au stress osmotique créé par le glycérol (Watson, 2000). Lors de la comparaison de l'efficacité de plusieurs cryoprotecteurs perméants, la concentration de 6 % de glycérol dans le dilueur s'est avérée produire une meilleure conservation de la motilité des spermatozoïdes de la semence congelée (Kundu et al., 2001).

### *1.2.3.2. Cryoprotecteurs non perméants*

Les cryoprotecteurs non perméants ne peuvent pas traverser la membrane plasmique du spermatozoïde. Leur action à l'extérieur de la cellule permet d'enrober les cristaux de glace formés par la congélation et protège ainsi les spermatozoïdes des déformations et lésions cellulaires. La présence de cryoprotecteurs non perméants augmente la concentration ionique du milieu extracellulaire et crée un gradient de concentration qui favorise la déshydratation du spermatozoïde, ce qui retarde la formation de glace intracellulaire. La conservation de la cellule est ainsi favorisée (Purdy, 2006).

Les cryoprotecteurs non perméants les plus courants qui ont été utilisés pour la conservation de la semence caprine comprennent 2-20% du jaune d'œuf (Tuli and Holtz, 1994) ou de lait écrémé (Leboeuf et al., 2000). Sans oublier leurs valeurs nutritionnelles, ces deux éléments ont été utilisés pendant des années comme composants de base dans les dilueurs pour la conservation du sperme à différentes températures. Le jaune d'œuf, à travers ses lipoprotéines, protège les spermatozoïdes de l'extérieur, en augmentant le ratio cholestérol/phospholipides de la membrane plasmique, ce qui diminue la fluidité membranaire et les lésions cellulaires. Pour le lait, son mécanisme de protection est basé sur la fixation de la micelle de caséine à la membrane plasmique du spermatozoïde (Bergeron et Manjunath, 2006). Cette fixation minimise la perte de lipides par la membrane plasmique et permet de maintenir la motilité et la viabilité de la semence pendant la conservation (Bergeron et al., 2007).

### *1.2.3.3. Substrats énergétiques*

Comme substrat énergétique, le dilueur contient un ou plusieurs sucres, tels que le glucose, le lactose, la raffinose, le fructose, le saccharose ou le tréhalose (Evans and Maxwell, 1987). Parmi les sucres, le glucose et le lactose sont facilement utilisés par les cellules pour la respiration et le maintien de l'équilibre osmotique. Le fructose connaît la concentration molaire la plus élevée dans le sperme du bouc (Aboagla and Terada, 2003) et constitue le substrat principal pour la glycolyse. Dès lors, il est fréquemment inclus dans un dilueur (Pellicer-Rubio et al., 1997).

### *1.2.3.4. Tampons*

Les tampons entrent à leur tour dans la composition des dilueurs afin de garder un pH extracellulaire optimal pour la survie des spermatozoïdes (qui varie de 6,7 à 7,0), ainsi qu'une osmolarité adéquate (entre 320-350 mOsm). Ceci aide à maintenir la viabilité et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes (Liu et al., 2016). Les tampons utilisés sont généralement des tampons à base de phosphate, de Tris, d'Hepes ou de citrate de sodium. Dans son étude, Tuli (1992) a observé que le Tris, comparativement à d'autres tampons, permet d'obtenir de meilleures motilités et viabilités de la semence fraîche et décongelée de boucs Boer. Les tampons aident à la déshydratation cellulaire par l'augmentation de la stabilité membranaire (Molinia et al., 1994).

#### 1.2.3.5. Sels

Il existe différents protocoles d'utilisation des sels (citrate de sodium, acide citrique) dans les dilueurs pour la conservation de la semence. L'acide citrique semble être le plus utilisé à des concentrations variantes entre 75 et 124 mM (Ritar et Salamon, 1991 ; Molinia et al., 1994).

#### 1.2.3.6. Antibiotiques

Les cryoprotecteurs permettent non seulement la conservation des cellules germinales, mais également des bactéries. Il est donc nécessaire d'ajouter des antibiotiques au dilueur de la semence afin de freiner la multiplication des bactéries. La pénicilline et la streptomycine sont les principaux antibiotiques ajoutés dans les dilueurs (Yaniz et al., 2005).

#### 1.2.4. Température de conservation

Le succès de l'insémination artificielle dépend de la gestion de la collecte, de la conservation et de l'utilisation du sperme. L'utilisation de la semence fraîche ou réfrigérée est recommandée lorsque le sperme va être conservé pendant des courtes durées et lorsqu'il va être transporté à des fermes proches en terme de distance (Leboeuf et al., 2000).

Après dilution, le sperme est refroidi progressivement à partir de la température de collecte (32 °C) pour atteindre la température de conservation (15°C ou 5°C). Comme le pouvoir fécondant des spermatozoïdes diminue progressivement pendant la conservation, chez le bélier le sperme dilué devrait être utilisé dans les 8-10 heures qui suivent la collecte. La diminution du pouvoir fécondant est de l'ordre de 10-35% par jour de conservation de la semence et est causée par la réduction de la motilité et de l'intégrité morphologique des spermatozoïdes (Maxwell and Salamon, 1993; Salamon and Maxwell, 2000).

La conservation du sperme en frais comme en congelé peut favoriser la maturation des spermatozoïdes à travers l'accélération des processus de capacitation et de réaction acrosomiale ce qui réduit la durée de vie ainsi que le pouvoir fécondant des spermatozoïdes après insémination artificielle (Parkinson, 2009).

De même que pour le sperme du bélier, le maintien d'un pouvoir fécondant satisfaisant du sperme caprin à l'état liquide et dans divers dilueurs est toutefois limité à 12-24h. Ce pouvoir diminue après suivant la durée de conservation (Cseh et al., 2012).

Chez les caprins, la semence est généralement conservée à des températures comprises entre 2 et 15°C. Un grand nombre de dilueurs a été utilisé pour la conservation en frais de la semence comme les dilueurs à base du lait écrémé naturel ou reconstitué et les dilueurs salins à savoir sodium-citrate-jaune d'œuf, sodium-citrate-fructose-jaune d'œuf et saccharose-EDTA-CaNa<sub>2</sub>-jaune d'œuf (Leboeuf et al., 2003b).

Il s'est avéré que la conservation à la température de 4°C est plus favorable que celle à 15°C pour la survie in vitro des spermatozoïdes pendant 7 jours. Une évaluation de la fertilité après IA (100 millions de spermatozoïdes par paillette de 0.25 ml) a été réalisée à partir d'éjaculats dilués dans le lait ou le phosphocaséinate natif (PPCN), après retrait ou non du plasma séminal, et conservation de 4h à 72h avant insémination. Le taux d'expulsions constatées (mises bas et avortements) après IA a diminué significativement avec l'augmentation de la durée de

conservation de la semence sans effet du dilueur utilisé et sans effet de la présence ou non du plasma séminal (Leboeuf et al., non publié). Ceci confirme l'absence d'effet du plasma séminal sur la conservation des spermatozoïdes en dépit de la présence des triglycérides résiduels dans le lait ou de phospholipides résiduels dans le PPCN. En prenant en considération la température de conservation, il est probable que l'activité de la lipase du plasma séminal est réduite à 4°C en comparaison avec 37°C (Pellicer-Rubio and Combarnous, 1998).

#### 1.2.5. Facteurs de variation de la qualité de la semence conservée en frais

##### 1.2.5.1. Dilueur utilisé

Le succès de la conservation de la semence à l'état liquide dépend en grande partie du type, de la composition ainsi que de la concentration du dilueur utilisé.

Chez les caprins, la majorité des dilueurs utilisés sont à base de Tris-glucose, du jaune d'œuf ou du lait écrémé avec un pH qui varie entre 6 et 8.

En routine, les milieux à base du lait écrémé sont les plus utilisés pour la conservation de la semence caprine à 4°C étant donné qu'ils procurent des bons résultats (Leboeuf et al., 2003b).

L'utilisation du lait écrémé a permis de maintenir une qualité supérieure par rapport au jaune d'œuf, lorsque la semence a été conservée pendant 72h à 4°C avec une IA fructueuse et maximale pendant 96h (Mushtaq et al., 2015).

En effet, la mise au point de dilueurs permettant d'améliorer la conservation et la capacité fécondante des spermatozoïdes a fait l'objet de diverses recherches. Différentes fractions du lait, à savoir le phosphocaseinate natif, et la  $\beta$ -lactoglobuline ont été testées. En comparaison avec le lait et après avoir étudié la motilité des spermatozoïdes, une meilleure qualité de la semence a été obtenue après une conservation de 7 jours dans un milieu à base de phosphocaseinate natif et de lactoglobuline (NPPC-BL) (Leboeuf et al., 2003b).

Dans leur étude, Chentouf and Bister (2012) ont comparé six dilueurs commerciaux soit l'INRA96, Ovixcell, Bioxcell, Triladyl, Andromed et Ovipro avec Ovidil, un dilueur mis au point par une équipe de recherche à l'université de Namur. D'après des analyses de la motilité et de la viabilité de la semence et parmi les sept dilueurs, Ovidil, Ovipro, Triladyl et INRA96 se sont démarqués des autres pour le maintien de la qualité de la semence à 4°C et pendant trois jours.

##### 1.2.5.2. Température de conservation

Un autre critère à considérer pour le maintien d'une semence de bonne qualité est le contrôle de la température. Il serait important de maintenir la semence à une température constante lors de l'entreposage et lors du transport. Un choc thermique, même d'une durée limitée, aurait un effet néfaste sur la qualité de la semence. Les principales températures utilisées pour la conservation à l'état liquide de la semence sont la conservation à température réduite (0-5°C ou 10-15°C) et à température ambiante par inactivation réversible des spermatozoïdes (Salamon and Maxwell, 2000).

La semence de bouc est conservée à des températures allant de 2 à 15°C, le plus souvent à 4°C. Une conservation à 4°C est préférable que 15°C dans les milieux à base de lait ou de phosphocaseinate natif (PPCN) (Leboeuf et al., 2003b).

De même, la motilité des spermatozoïdes est maintenue plus longtemps à 5°C qu'à 15°C ou 20°C lorsqu'un dilueur synthétique (Androhep) est utilisé (Xu et al., 2009).

### 1.2.5.3. Utilisation d'antioxydants

Les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'oxide nitrique (NO) et l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) sont produits par les spermatozoïdes. La mitochondrie est une source majeure de leur production chez les spermatozoïdes humains (Koppers et al., 2008). Dans la semence, la génération des DRO est principalement causée par les spermatozoïdes morts suite à une réaction catalysée par une oxydase d'acide aminé aromatique (Upreti et al., 1998). Les DRO sont connus pour causer des dommages oxydatifs aux lipides membranaires et à l'ADN et inactiver les protéines (De Lamirande et al., 1997, Sanocka et al., 2004). Leur excès est également corrélé à une diminution de la motilité (Gomez et al., 1998).

Pour se protéger de l'effet néfaste des DRO, les spermatozoïdes font appel aux enzymes antioxydantes présentes dans leur cytoplasme, telles que la catalase, la dismutase superoxyde et la glutathion peroxydase (Aitken et al., 2010). Des agents réducteurs comme le glutathion, l'acide ascorbique et la taurine présents dans les spermatozoïdes ou dans leur environnement leur protègent aussi des DRO (Medeiros et al., 2002). Cependant, lorsqu'il y'a un excès dans la production des DRO à la suite d'un refroidissement-réchauffement par exemple, les enzymes restent peu actives pour protéger les spermatozoïdes. L'utilisation des antioxydants pour contrôler le niveau des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et améliorer la qualité de la semence a été démontrée avec succès. Pomares et al. (1994) rapportent une amélioration de la viabilité des spermatozoïdes durant 12 jours de conservation à 4°C, lorsqu'on incorpore de la glutathion peroxydase (1 unité / ml) dans le milieu de conservation à base de Tris. Toujours dans le même milieu, l'incorporation d'autres antioxydants, tels que la catalase, le cytochrome c, la glutathion peroxydase, en plus de la superoxyde dismutase, améliore la survie des spermatozoïdes pendant 6 jours de conservation à 5°C, mais qui ne s'accompagne pas d'un meilleur taux de fécondation *in vitro* (Stojanov et al., 1994 ; Pomares et al., 1994 ).

Une étude réalisée par Labbé et son équipe en (2003) portait sur l'addition aux milieux à base du lait ou du PPCN de 5 antioxydants (catalase, 200UI.ml<sup>-1</sup> ; glutathion peroxydase, 10 UI.ml<sup>-1</sup> ; superoxyde dismutase, 800 UI.ml<sup>-1</sup> ; taurine 1,75 mg.ml<sup>-1</sup> ; vitamine E, 8 µg.ml<sup>-1</sup>) avant d'être conservés à 4°C pendant 7 jours. D'après les résultats, aucun effet d'antioxydant sur le pourcentage de spermatozoïdes mobiles à J0, J3 et J7 n'a été observé. Cependant, au J7, une réduction très forte de la teneur en malondialdéhyde (MDA) a été enregistrée dans les deux milieux contenant la vitamine E, ce qui confirme que l'incorporation de vitamine E (8µg/ml) dans le dilueur réduit la peroxydation des lipides membranaires.

Par ailleurs, l'utilisation d'antioxydants reste à prendre avec précaution. En effet, malgré que les DRO sont principalement connus pour avoir un effet néfaste sur les cellules, ils montrent un effet bénéfique sur les spermatozoïdes en jouant un rôle dans la capacitation et la réaction acrosomiale (Gonçalves et al., 2010). Pour ceci, une supplémentation non contrôlée en antioxydants peut influencer ces mécanismes et par conséquent réduire le pouvoir fertilisant de la semence.

#### 1.2.5.4. Saison de l'année

L'étude de l'aptitude de conservation de la semence caprine fraîche au cours des saisons reste inexistante. La seule étude qui a été réalisée en frais, concerne le bélier. Dans leur étude chez la race INRA 180, Benmoula et al. (2017), ont rapporté qu'à 15°C, l'aptitude de conservation de la semence est meilleure en hiver et en été par rapport aux autres saisons. Les auteurs ont suggéré une liaison avec les concentrations en lipides totaux et en cholestérol qui ont été élevées durant ces saisons.

De même mais cette fois-ci en congelé, D'Alessandro and Martemucci (2003) ont trouvé que chez la race ovine Leccese, la semence est mieux conservée si elle a été collectée en en été et en automne.

Chez les caprins, la littérature qui existe sur l'aptitude de congélation de la semence et sur la variation du pouvoir fécondant du sperme suivant la saison sexuelle reste contradictoire. Plusieurs études ont montré que la semence collectée en saison sexuelle, se conserve mieux (Boué and Corteel, 1992; Muhuyi et al., 1992 ; Tuli and Holtz, 1995). Cependant, Summermatter et Flukiger (1982) n'ont pas trouvé de différences entre les saisons.

A l'échelle de l'année, et chez la race Banche d'Andalousie en Espagne, Gallego et son équipe (2015) ont rapporté que la qualité de la semence collectée en hiver reste meilleure après congélation-décongélation. Cependant, Wang et al. (2015) ont trouvé que la semence des boucs de race croisée Xinnong x Saanen, se conserve mieux en été et en automne.

## 2. La maîtrise de la reproduction chez la chèvre

### 2.1. Activité saisonnière des chèvres

Chez la chèvre, l'activité reproductrice a un caractère saisonnier qui diffère d'une race à une autre. Plusieurs facteurs influencent le début et la durée d'anœstrus chez les chèvres à savoir la latitude, le climat, la race, le stade physiologique, la présence du mâle, le système d'élevage et principalement la photopériode (Fatet et al., 2011).

Les caprins sont sensibles au contrôle photopériodique de façon que les jours courts induisent l'activité sexuelle, contrairement aux jours longs qui l'inhibent (Chemineau et al., 1988). L'information photopériodique (perception d'obscurité ou d'éclairement) est transmise par l'intermédiaire de la rétine et par voie nerveuse jusqu'à la glande pinéale. Celle-ci libère la mélatonine qui est le messager permettant au système nerveux central d'interpréter le signal photopériodique. En effet, cette hormone est sécrétée uniquement en phase obscure (Chemineau et al., 1992a). Au printemps, lorsque les nuits sont courtes, la sécrétion est moindre. Au contraire, en été, lorsque la durée de la nuit commence à augmenter, la sécrétion devient plus importante ce qui déclenche l'activité sexuelle des chèvres.

Une reproduction saisonnière est observée chez la plupart des races de chèvres provenant de hautes latitudes (> 35°N) et dans certaines races locales des latitudes moyennes (25 à 35 °N) (Fatet et al., 2011).



Dans les régions tempérées, une saison de reproduction est enregistrée en automne et en hiver. En France (45°N de latitude), la saison sexuelle commence en septembre, lorsque la durée du jour diminue et persiste jusqu'à mars (Bodin et al., 2007). En Australie (10 à 39°S de latitude), les chèvres ont une période d'activité ovulatoire plus courte, qui s'étend d'avril à août avec un pic en juin (Restall, 1992).

Chez les chèvres Alpines et locales élevées au Mexique, la saison de reproduction commence au début de l'automne et se termine à la fin de l'hiver (Delgadillo et al., 1997; 2004).

Dans les zones à faible latitudes, les régions équatoriales, tropicales et subtropicales où les variations de la durée du jour sont moins prononcées, la saisonnalité de la reproduction est moins marquée et la plupart des chèvres locales dans les tropiques ont la capacité de se reproduire tout au long de l'année avec un anœstrus postpartum relativement court. Cependant, les facteurs environnementaux à savoir la disponibilité du fourrage et les changements de température ont une forte influence qui souvent ne permet pas aux chèvres d'exprimer leurs performances reproductives. Une alimentation insuffisante est souvent responsable de l'apparition de périodes anovulatoires prolongées, d'une réduction de la fertilité et de la prolificité et entraîne également une mortalité printanière élevée (Delgadillo et al., 1997; 2004).

Chez la chèvre locale du Nord du Maroc, élevée dans une zone de latitude moyenne (35 °N), la reproduction a un caractère saisonnier marqué influencé par la photopériode (fig.4). La venue en chaleurs et l'ovulation diminuent progressivement à partir du solstice d'hiver pour s'arrêter complètement d'Avril à Juin (anœstrus saisonnier) et reprendre progressivement vers le solstice d'été (Chentouf et al., 2011).

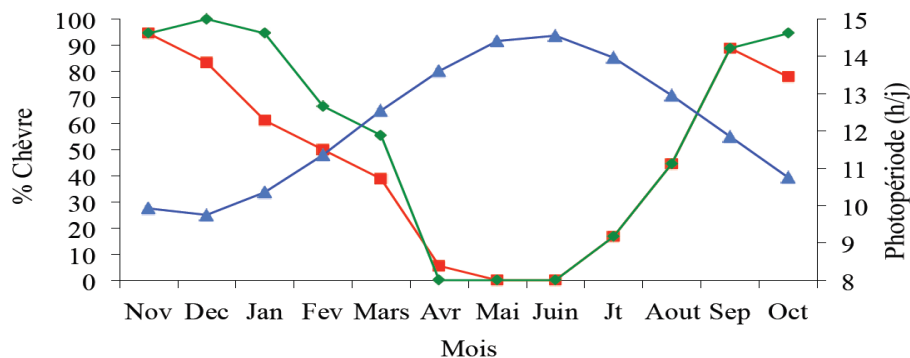


Figure 4. Fluctuation de la photopériode (▲) et évolution mensuelle de l'incidence des chaleurs (■) et des ovulations (◆) des chèvres du Nord du Maroc (Chentouf et al. 2011).

### 2.1.1. Cycle œstral en saison sexuelle

La chèvre est une espèce polyœstrienne saisonnière (distribution groupée des cycles œstraux qui se produisent régulièrement tout au long de la saison sexuelle). Le cycle œstral de la chèvre dure en moyenne 21 jours avec d'importantes variations selon la race et le stade de la saison sexuelle (Fatet et al., 2011). Des cycles courts sont observés principalement en début de la saison de reproduction ou lors de l'induction de l'œstrus par effet mâle (Lassoued et al., 1995). Ceci est probablement associé à une régression prématurée du corps jaune (Chemineau et al., 2006). Le cycle œstral est caractérisé par deux phases distinctes (Fig. 5) : la phase folliculaire

et la phase lutéale (Abecia et al., 2012). La phase folliculaire correspond à la vague de développement folliculaire qui fournira le ou les follicules ovulatoires et implique la croissance terminale des follicules qui dépendent des gonadotrophines jusqu'à l'ovulation (Amiridis and Cseh, 2012). Pendant la phase folliculaire, qui dure environ 4 jours, il y a une croissance des follicules ovariens qui est stimulée par la FSH et la LH, hormones sécrétées par l'hypophyse (Baril et al., 1993) (Fig. 5). Plusieurs follicules antraux d'un diamètre de 2 à 3 mm, sont recrutés et les follicules entrent dans leur phase terminale de croissance (Gama and Bressan, 2011). Seulement deux à trois de ces follicules atteignent une taille de 4 mm de diamètre et sont sélectionnés pour entrer dans la phase de dominance. Sous l'influence de la LH, des follicules atteignent le stade pré-ovulatoire (6-9 mm), tandis que les autres dégénèrent (atréisie folliculaire). L'augmentation des concentrations périphériques d'œstradiol  $17\beta$ , en raison de la croissance folliculaire, induit le comportement œstral de la chèvre et provoque un effet de rétroaction positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Jiang et al., 2016). L'augmentation consécutive de la sécrétion de la gonadolibérine (GnRH) induit un pic de LH préovulatoire, qui induira l'ovulation (20 et 26 heures plus tard) et la lutéinisation des cellules folliculaires se produira (Fig. 6).

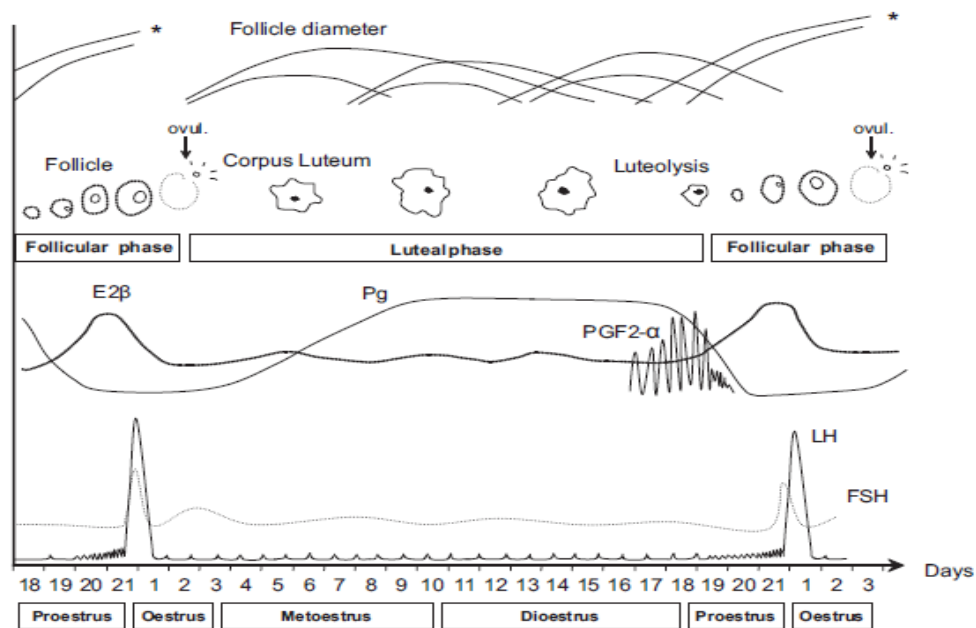


Figure 5. Schéma représentatif des différents événements physiologiques survenant au cours du cycle œstral chez la chèvre : la croissance folliculaire, le cycle ovarien et les régulations endocriniennes. \*Follicule ovulatoire (Fatet et al., 2011).

Généralement, il y a entre deux et six vagues folliculaires pendant le cycle œstral. Chez les chèvres locales du Nord du Maroc, trois vagues ont été enregistrées (Chentouf et al., 2011). La dernière vague folliculaire est celle qui va donner naissance au follicule pré-ovulatoire. Parfois, lorsque des doubles ovulations surviennent, il se peut que les follicules ne soient pas issus de la même vague folliculaire mais plutôt des deux vagues folliculaires consécutives (Ginther et Kot, 1994).

Le début de la phase folliculaire, avant que le comportement œstral soit observé, est connu sous le nom du *prœstrus*.

La phase d'œstrus comprend les événements du comportement sexuel de la chèvre jusqu'à l'ovulation. Sa durée est influencée par la race, variant entre 22 h de réceptivité sexuelle chez les chèvres angora (Van Rensburg, 1971) et 96 h chez les chèvres naines (Jarosz et al., 1971). Chez les chèvres, la longueur d'œstrus la plus couramment enregistrée est entre 36 et 37 heures (Shelton, 1978; Greyling, 2000). Parmi les signes externes de l'œstrus qui peuvent être mentionnés comme importants, on trouve le déplacement de la queue, l'augmentation des vocalisations, la diminution de l'appétit, les chèvres montent entre elles, l'augmentation d'excrétion d'urine, l'œdème de la vulve et l'écoulement d'un mucus vaginal séreux à muqueux. La phase lutéale commence après l'ovulation et elle dure environ 14,5 jours chez la race locale du Nord du Maroc. Au cours de cette phase, la LH est libérée d'une façon pulsatile dont la fréquence est corrélée négativement avec la progestérone (Sutherland, 1987). Cette dernière, produite par le corps jaune, issu de la lutéinisation du follicule ovulatoire, exerce un rôle clé de rétroaction négative dans la régulation de la LH au cours du cycle (Fig. 6).

Aux alentours des jours 16-17 du cycle œstral, les prostaglandines utérines, sous l'influence de l'ocytocine ovarienne provoquent la lutéolyse (Zarrouk et al., 2001). Immédiatement après celle-ci, la brusque diminution de la progestérone provoque une forte augmentation de la fréquence de décharge des pulses de LH et de leur amplitude (Mori and Kano, 1984; Sutherland, 1987). Cette augmentation de l'activité gonadotrope va préparer pour une nouvelle ovulation (Lopez-Sebastian et al., 2014).

Chez la chèvre Beni Arouss, au vu du contexte alimentaire de la région (conduite en extensif), de la période de lutte qui n'est pas contrôlée dans le temps et de l'évolution mixte des mâles et des femelles durant toute l'année, les performances de reproduction restent relativement bonnes avec un taux de fertilité de 79 % et un taux de prolificité de 125 % (Chentouf et al., 2006, Chentouf, 2007).

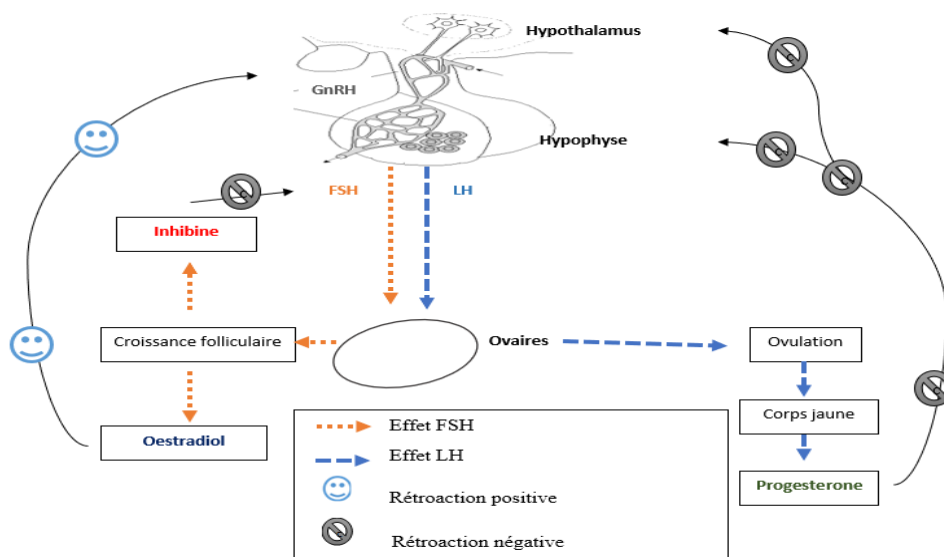


Figure 6. Régulation hormonale du cycle œstral chez la chèvre.

### 2.1.2. Activité sexuelle en anœstrus saisonnier

Chez les races saisonnées, la période de repos est caractérisée par l'établissement d'un état d'anœstrus associé à l'absence d'œstrus et d'ovulations.

Chez la chèvre locale du Nord du Maroc, les durées des périodes d'anovulation et d'anœstrus sont respectivement de 200 et 209 jours (Chentouf, 2007).

En période d'anœstrus saisonnier, on observe une faible fréquence de décharge des pulses de LH, alors qu'il n'y a pas de progestérone endogène. La fréquence et l'amplitude n'augmentent qu'à l'approche de la saison sexuelle.

La faible activité de la LH pendant l'anœstrus saisonnier est due à une rétroaction négative forte de l'œstradiol 17 $\beta$  sécrétée par les follicules, sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Chemineau and Delgadillo, 1994) (Fig. 6). Cette augmentation saisonnière de la rétroaction négative de l'œstradiol est sous le contrôle de la photopériode par l'intermédiaire de la mélatonine (Chemineau et al., 1988).

## 2.2. Utilisation des traitements hormonaux pour l'induction et la synchronisation d'œstrus chez la chèvre

### 2.2.1. L'Acétate de Fluorogestone et son efficacité pour la maîtrise de la reproduction caprine

Plusieurs protocoles de synchronisation d'œstrus ont été développés au niveau des centres de recherches ovines et caprines et vulgarisés dans le monde entier. Ces protocoles sont basés sur l'utilisation de la progestérone naturelle ou des progestagènes sous forme de dispositifs vaginaux (éponges ou spirales) ou d'implants sous-cutanés (Fonseca and Torres, 2005; Abecia et al., 2012).

Le traitement hormonal peut être utilisé en saison ou en contre-saison sexuelle avec un protocole qui diffère selon le type de dispositif hormonal utilisé, sa durée de maintien, les hormones utilisées en combinaison et le moment d'application (Menchaca and Rubianes, 2007; Modu-Bukar et al., 2012).

L'objectif principal du traitement progestatif est d'imiter les conditions hormonales d'une phase lutéale d'un cycle sexuel normal. En effet, il mime l'action d'un corps jaune actif qui libère de la progestérone et bloque la venue en chaleurs. La progestérone libérée à travers ce traitement (progestérone exogène) imite l'action de la progestérone endogène et agit par rétroaction négative sur l'hypothalamus qui sécrète la GnRH. De ce fait, la croissance des follicules est au ralenti et l'ovulation est inhibée pendant le traitement. A la fin du traitement, la progestérone chute, ce qui permet la reprise de l'activité sexuelle par l'induction d'une nouvelle phase folliculaire et la synchronisation des chaleurs chez la chèvre. La réponse à un traitement progestatif dépend de la phase du cycle durant laquelle le traitement a commencé. Par exemple, au cours de la phase lutéale, une accélération de la croissance folliculaire est enregistrée, mais le nombre des grands follicules diminue ce qui augmente l'incidence des atresies et la persistance du follicule dominant (Nava-Trujillo et al., 2010). L'application du traitement hormonal au cours de la phase folliculaire, augmente le nombre des grands follicules alors que le taux d'ovulation diminue (Riaz et al., 2012).

Cependant, l'utilisation des traitements progestagènes pour induire l'œstrus en contre-saison sexuelle provoque une forme de diœstrus et par conséquent le développement d'un ou des follicules ovariens normaux. Après le retrait du dispositif, une ou plusieurs ovulations peuvent avoir lieu, à la suite de la suppression du feedback négatif exercé par la progestérone sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.

En effet, les protocoles de synchronisation réussis doivent non seulement établir une synchronisation étroite, mais ils doivent également fournir des niveaux de fertilité acceptables lors de l'accouplement naturel ou de l'insémination artificielle (Whitley and Jackson, 2004).

Depuis 1960, les éponges vaginales ont été le traitement traditionnel de choix pour la synchronisation et l'induction d'ovulation chez les petits ruminants. Ce sont des éponges imprégnées de progestatifs efficaces à des doses plus faibles que la progestérone naturelle. Deux types d'éponges sont actuellement disponibles sur le marché, une à base d'Acétate de Fluorogestone (FGA), commercialisée sous le nom de Chronogest (Intervet, France) et l'autre à base d'Acétate de Médroxyprogestérone (MAP) commercialisée sous le nom de Veramix (Pharmacia & Upjohn, Canada). Les éponges vaginales ont généralement des taux de rétention élevés (supérieurs à 90%) avec un début d'œstrus qui a lieu dans les 24 à 48h suivant le retrait d'éponge.

Chez les chèvres, les éponges à base de FGA et de MAP sont avérées efficaces pour la synchronisation œstrale. La réponse œstrale et la fertilité varient cependant considérablement en fonction de la race, des traitements combinés et du système d'accouplement (Wildeus, 2000).

#### 2.2.2. Facteurs influençant la réponse au traitement

##### a. Concentration de la progestérone

La plupart des protocoles d'induction et de synchronisation d'œstrus établis chez les chèvres sont basés sur l'utilisation d'éponges imprégnées de 20 à 40 mg d'acétate de fluorogestone (FGA) ou de 50 à 60 mg de médroxyprogestérone (MAP). Le CIDR est apparu dans les années 1980, c'est un élastomère de silicone inerte contenant 0,3 g de progestérone naturelle (P4) administré par voie vaginale (Knights et Singh-Knights, 2016). Montlomo et al. (2002) ont comparé l'utilisation de traitements à base de MAP (60mg), FGA (40mg) et CIDR (0,3g) chez les chèvres de la race Boer d'Afrique du Sud pendant la saison sexuelle. D'après les résultats, le traitement n'a pas eu d'influence sur la réponse œstrale, mais le délai d'apparition de l'œstrus était plus court de 3 à 5 heures avec le CIDR en comparaison avec l'éponge vaginale (FGA ou MAP). Aucun effet du traitement sur le taux de fertilité n'a été enregistré après IA.

Dans le coût de production du FGA, la composante la plus dispendieuse est la progestérone. En tenant compte de cette considération et de la diminution des résidus dans le lait et la viande, quelques études ont été réalisées pour tester l'efficacité d'une éponge FGA contenant différentes concentrations de progestagène, à induire et à synchroniser les chaleurs chez les chèvres (Leboeuf et al., 2003a). Des traitements d'une durée de 12 jours avec des éponges FGA qui contenaient 20 mg ou 45 mg de cronolone ont été testés chez des chèvres laitières en saison sexuelle et en anœstrus saisonnier. À la suite du retrait d'éponge, les chaleurs ont été déclenchées chez un nombre de chèvres similaire pour les deux traitements. À la suite du dosage de la LH, les auteurs ont montré que les chèvres ayant reçu 20mg de FGA ont eu leur

pic de LH avant les chèvres qui ont reçu 40mg de FGA (28,7 h et 30,8 h après retrait d'éponge, respectivement). Cela laisse supposer que l'utilisation d'une dose élevée de progestagène génère, après retrait d'éponge, un niveau élevé de progestagène résiduelle, ce qui entraîne une latence hormonale responsable du retard observé dans la réponse de la femelle au traitement (Crosby et al., 1991 ; Gereyling et al., 1997).

Le taux de fertilité obtenu après IA a été élevé et similaire pour les deux groupes. Ainsi, l'utilisation d'éponge FGA, contenant moins de progestagène, permettait de réduire le coût du dispositif, tout en atteignant des taux d'induction des chaleurs et de fertilité similaire à ceux obtenus avec une FGA ayant un taux de progestagène et un coût plus élevés.

#### *b. Durée de maintien d'éponge*

La fonction du corps jaune est simulée par l'application de progestérone ou de l'un de ses composés analogues. La libération de gonadotrophines est inhibée par la progestérone et, par conséquent, l'ovulation est également inhibée jusqu'à ce que la progestérone soit éliminée. Si la progestérone est appliquée à un groupe de femelles et retirée simultanément, cela synchronisera l'œstrus et l'ovulation dans ce groupe. La progestérone a été initialement administrée pendant une durée égale à la durée de la phase lutéale naturelle. Cette période est suffisamment longue pour permettre au corps jaune de subir une régression rapide chez tous les animaux et quel que soit le stade du cycle auquel les animaux se trouvaient au départ (Holtz, 2005).

Les traitements progestatifs à long terme (18 à 21 jours) ont entraîné de faibles taux de fertilité. Ceci est dû en partie à l'ovulation de follicules persistants contenant des ovocytes de qualité réduite. La faible fertilité peut aussi être due aux effets indésirables des progestatifs dans l'environnement intra-utérin, qui affectent le transport et la survie des spermatozoïdes (Leboeuf et al., 2003a). Des durées réduites de traitement progestatif (7 à 12 jours) peuvent minimiser les pertes vaginales et les infections et augmenter la fécondité et la fertilité, mais le taux de synchronisation sera réduit, car dans de tels cas, le corps jaune potentiellement présent peut survivre au-delà de l'élimination de la progestérone exogène.

Actuellement, le traitement progestatif intravaginal à court terme est préconisé, mais il est crucial d'inclure un agent lutéolytique en association avec le traitement à la progestérone à court terme afin d'induire la lutéolyse d'un corps jaune éventuellement présent. Cette technique est applicable pendant la saison de reproduction et en anœstrus saisonnier. Durant ce dernier, l'induction de l'ovulation est nécessaire, à travers l'administration d'eCG (Wildeus, 2000; Pierson et al., 2001).

Généralement, la chèvre manifeste un œstrus dans les 48 heures qui suivent le retrait d'éponge.

#### *c. Injection de l'eCG en combinaison avec la FGA*

Dans le but d'optimiser les conditions hormonales recréées lors de la baisse de progestérone au retrait des éponges FGA, il est souhaitable d'avoir recours à l'injection d'une hormone folliculostimulante qui améliore la croissance et le développement folliculaire, surtout en anœstrus saisonnier. Lors d'un cycle sexuel normal en saison sexuelle, la baisse de progestérone, à la suite de la lutéolyse, lève le frein sur la sécrétion de GnRH et permet

l'augmentation de la libération de LH. Toutefois, contrairement à la saison sexuelle, en anœstrus saisonnier, la sécrétion de GnRH, et ainsi celle de LH sont inhibées par l'œstradiol, ce qui rend la supplémentation en hormone folliculostimulante essentielle.

L'eCG (anciennement nommée PMSG : Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) est une hormone glycoprotéique naturelle extraite du sérum de la jument gestante (Abecia et al., 2011). Utilisée chez la chèvre, elle stimule la croissance des follicules ovariens à la fois pour l'induction et la synchronisation d'œstrus et pour l'amélioration de l'ovulation (Herve et al., 2004). Ceci lui attribue à la fois un effet FSH, prédominant, et LH (Mapletoft et al., 2002).

À certaines doses, l'eCG pourrait permettre une augmentation du taux d'ovulation (Knight et al., 1989) et, par conséquent, possiblement de la prolificité. Cette hormone est commercialement disponible depuis le début des années 1960 et elle est utilisée de façon routinière dans les traitements d'induction et de synchronisation de l'œstrus chez la chèvre comme dans d'autres espèces.

Plusieurs études ont évalué l'effet de la dose d'eCG et de son moment d'injection sur l'induction et ou la synchronisation d'œstrus chez la chèvre. Les doses préconisées d'eCG varient de 250 à 1000 UI, selon l'âge, la saison de reproduction, l'état physique, l'espèce et la race. L'injection d'eCG peut être réalisée 48 heures avant ou au moment du retrait d'éponge.

En France, chez la chèvre primipare ou multipare, la dose courante de 400 UI d'eCG est augmentée de 100 UI pour des inséminations avant le 15 juin. Une dose supplémentaire de 100 UI est administrée aux chèvres produisant plus de 3,5 kg/j de lait, quelle que soit la période d'IA (Leboeuf, 1992).

Les travaux de Corteel et al. (1968) et Leboeuf et al. (1994), ont montré que la fertilité après IA est plus élevée quand l'injection d'eCG est réalisée 48 heures avant le retrait de l'éponge (53%), que lorsqu'elle a lieu au retrait (45%). En résumé, le traitement de synchronisation le plus traditionnellement utilisé pour les chèvres laitières en France consiste en l'insertion d'une éponge vaginale imprégnée de 45 mg de FGA pendant 11 jours, avec injection intramusculaire de 400 à 600 UI d'eCG (selon le niveau de production laitière et la saison de traitement) et 50 µg de cloprosténol, administrés 48 heures avant le retrait de l'éponge. L'insémination des chèvres traitées est réalisée à 43-45 h après retrait d'éponge avec une dose de  $1 \times 10^8$  spermatozoïdes de la semence congelée-décongelée (Corteel et al., 1988). Avec ce protocole, le taux de fertilité obtenu est de 60 à 65% (Leboeuf et al., 2000; Boué and Sigwald, 2001).

Dans une étude récente, chez la chèvre Angora en saison sexuelle, l'équipe de Tirpan et al. (2018) a comparé l'effet de trois doses d'eCG (300, 400 et 500 UI) utilisées dans un traitement en combinaison avec des éponges FGA (30mg, 11j) et de prostaglandine  $2\alpha$  (150µg) injectée au moment de la pose d'éponge sur la synchronisation d'œstrus et le taux de gestation après IA. L'eCG a été injectée 24h avant le retrait d'éponge et les chèvres ont été inséminées 43 à 45h après retrait d'éponge avec une dose de  $2 \times 10^8$  spermatozoïdes de semence fraîche. D'après les résultats, les différentes doses d'eCG dans un traitement de 11 jours avec des éponges FGA peuvent être utilisées pour synchroniser l'œstrus chez les chèvres Angora pendant la saison de reproduction. Les meilleurs résultats en termes de précision de détection d'œstrus et de taux de gestation après IA ont été obtenus lorsque 300 UI d'eCG ont été utilisées. Des doses plus élevées de 400 à 500 UI d'eCG ont retardé l'ovulation. Selon les auteurs, cela peut être expliqué par le fait que le temps de demi-vie d'eCG est de 40 à 125 heures alors que celui de la FSH est

de 2 à 3 heures. La latence observée suite à la dose élevée d'eCG a entraîné un retard dans le délai de pic de LH ce qui a retardé l'ovulation.

Généralement, après un traitement combiné progestagène et eCG, les chèvres ont tendance à manifester leurs chaleurs après environ 24 heures et l'ovulation survient environ 55 heures après la fin du traitement (Leboeuf et al., 1996). Cependant, l'inconvénient majeur associé à l'utilisation de l'eCG reste la formation d'anticorps anti-eCG chez les chèvres après l'utilisation répétée de cette hormone (Herve et al., 2004; Lopez-Sebastian et al., 2007). Le développement de ces anticorps agit négativement sur la fertilité des chèvres dans les programmes d'IA en raison du retard de l'œstrus et/ou de l'ovulation ou même de l'absence de la réponse ovulatoire (Drion et al., 2001). Une baisse de fertilité de 60 à 40% a été enregistrée chez les chèvres laitières en France (Baril et al., 1992; 1993).

#### *d. Injection de la PGF en combinaison avec la FGA*

Grâce à l'utilisation de la prostaglandine F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), il est possible d'avoir recours à un traitement FGA de 11j chez des chèvres en saison sexuelle ou encore cycliques durant la période théorique d'œstrus saisonnier. En effet, en œstrus saisonnier, il est possible qu'un certain pourcentage de chèvres, variable entre les races, ait un cycle sexuel actif (Chemineau et al., 1992b). L'injection de la prostaglandine F2 $\alpha$  permet de détruire tous les corps jaunes qui peuvent être présents sur les ovaires des chèvres (Abecia et al., 2011) et ainsi éliminer la source de progestérone endogène au moment de retrait de l'éponge vaginale délivrant le progestérone exogène. La prostaglandine ou ses analogues peuvent être utilisés en combinaison avec les éponges intravaginales imprégnées de FGA et l'eCG. Une meilleure fertilité (94%) est obtenue après injection de 50 $\mu$ g de Cloprostenol (analogue de la prostaglandine F2 $\alpha$ ) et 750 UI d'eCG 48h avant le retrait des éponges FGA (insérées sur une durée de 11j) chez des chèvres Alpines en contre-saison (Freitas et al., 1996).

Une autre méthode peut être appliquée et consiste en deux injections de prostaglandine F2 $\alpha$  réalisées à 11 jours d'intervalle, cette méthode n'est efficace que pendant la saison sexuelle (Wildeus, 2000; Dogan et al., 2016). Kusina et al. (2000) et Holtz et al. (2008) ont constaté que deux injections de cloprostenol (125  $\mu$ g chez des chèvres Mashona et 37,5  $\mu$ g chez des chèvres Naines) administrées à 10 jours d'intervalle étaient aussi efficaces que les traitements progestatifs pour la synchronisation d'œstrus en saison sexuelle.

### **2.3. Utilisation de l'effet bouc pour l'induction et la synchronisation d'œstrus chez la chèvre**

#### **2.3.1. Description de l'effet bouc**

Face à l'évolution récente des préoccupations sociétales vers le respect du bien-être animal sous toutes ses facettes ainsi que vers le renforcement de la sécurité alimentaire des produits animaux à travers une réduction des résidus présents dans le lait et la viande, une utilisation limitée d'hormones exogènes, en les remplaçant par l'effet mâle est à prospecter.

De plus, une apparition d'anticorps anti-eCG est enregistrée lors des utilisations répétées des traitements hormonaux avec l'eCG (Roy et al., 1999; Leboeuf et al., 2000).



L'effet mâle, également connu sous le nom de biostimulation (Martin et al., 2004; Delgadillo et al., 2009), est décrit comme étant l'influence du mâle sur le comportement d'œstrus et l'activité ovarienne chez la femelle. Ce phénomène est médié par des phéromones et des signaux reçus et traités par les femelles. Il a été décrit pour la première fois chez les ovins il y a plus de 70 ans et a été appelé « effet bélier » (Underwood et al., 1994). Chez les caprins, ce phénomène appelé « effet bouc » a été décrit plus tard (Shelton, 1960).

L'introduction d'un bouc dans un troupeau de chèvres active la sécrétion de la LH chez ces dernières (réponse à court terme), suivie d'une ovulation (réponse à long terme) (Vielma et al., 2009; Bedos et al., 2010). Une augmentation de pulsativité de la LH est observée en quelques minutes après l'introduction du bouc (Chemineau and Delgadillo, 1994). Si le contact avec le mâle est maintenu, les chèvres ont un pic préovulatoire de LH 1 à 3 jours après l'introduction du mâle (Fernandez et al., 2011). Simultanément, une augmentation de la concentration de la FSH se produit (Martin et Scaramuzzi, 1983). Chez les chèvres l'ovulation a lieu 2 à 4 jours après l'introduction du mâle avec une grande proportion (60%) qui présente un comportement œstral avec la première ovulation (Walkden-Brown et al., 1993). A peu près 75% des chèvres auront un cycle ovarien court de 5 à 7 jours, suivi d'une deuxième ovulation associée avec comportement œstral et une phase lutéale normale (Flores et al., 2000; Chemineau et al., 2006).

### 2.3.2. Mécanismes impliqués

La réponse de la femelle à l'effet bouc est multisensorielle et implique des signaux olfactifs, visuels, tactiles et auditifs. Elle est plus élevée lorsque tous les sens sont présents, c'est-à-dire lorsqu'un contact direct entre les deux sexes existe (Delgadillo et al., 2009).

Des études de Walkden-Brown et al., (1993) indiquent que l'odeur du bouc seule ne peut pas déclencher une ovulation chez la majorité des chèvres. De plus, chez la chèvre créole naine des Caraïbes, Chemineau et al. (1986) ont trouvé que l'induction d'anosmie (suppression d'odorat) chez la femelle n'empêche pas la réponse à l'effet bouc, bien que la proportion de femelles présentant un œstrus ou une ovulation diminue (50% chez les femelles anosmiques contre 89% chez les femelles témoins).

Plus loin, Vielma et al. (2005) ont rapporté que la présence d'un mâle sexuellement actif ou tout simplement l'émission de ses vocalisations via un système de haut-parleurs peuvent induire un œstrus anovulatoire chez des chèvres, mais l'enregistrement seul ne semble pas induire l'ovulation. Shelton (1980) a par ailleurs rapporté une augmentation du nombre de chèvres qui ovulent en réponse à l'odeur et aux vocalisations émises par les boucs (+13 à 29%). Les différences entre les deux études peuvent être dues à une certaine distorsion des vocalisations lors de l'émission du signal acoustique pour la lecture, ou au fait que les vocalisations émises par les mâles en présence de femelles en chaleurs ne sont pas pertinentes pour les chèvres qui sont encore en anœstrus.

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que les signaux olfactifs provenant des phéromones produites par les mâles, par stimulation des androgènes (Gelez and Fabre-Nys, 2004), associés à des stimulus comportementaux générés principalement lors de l'accouplement (Rosa and Bryant, 2002) sont susceptibles de jouer un rôle stimulant.

En effet, les odeurs caractéristiques du mâle proviennent des glandes sébacées, où elles sont produites, et sont directement liées à la concentration de la testostérone (Iwata et al., 2000). Ces substances sont détectées par les neurones récepteurs olfactifs, capables de détecter les odeurs volatiles, ou les neurones récepteurs voméronasaux, qui détectent les molécules de phéromone (Murata et al., 2009). L'interaction initiale entre les mâles et les femelles se produit

par la reconnaissance des phéromones, produits chimiques transportés principalement par l'air et excrétés dans les fèces, l'urine ou par les glandes cutanées. Elles sont distinguées principalement par le système olfactif et peuvent provoquer des altérations comportementales et endocriniennes dans le cadre d'une communication chimique (Castañeda Arteaga et al., 2007).

Chez le mâle, la réponse consiste notamment par l'expression du « Flehmen ». En fait, c'est à travers ces stimulus de phéromones et la vue et le contact physique avec le mâle qu'il y a restauration de l'activité hormonale chez la femelle, avec comme conséquence la manifestation de l'œstrus.

La présence du mâle est perçue par la reconnaissance des phéromones par le système olfactif, qui transmet un signal au noyau médian de l'amygdale, relayé vers l'hypothalamus générateur des pulses GnRH (Murata et al., 2009). Par conséquent, la fréquence et l'amplitude de la sécrétion pulsatile de LH augmentent (Chemineau, 1986; Alvarez et al., 2009). Ainsi, l'exposition des femelles aux mâles sexuellement actifs favorise une activation rapide de la sécrétion de LH et une diminution de la rétroaction négative de l'œstradiol sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ceci conduit à l'induction d'un pic préovulatoire de LH (Signoret, 1980), générant ensuite une réponse rapide suivie d'une réponse à long terme, lorsqu'il y a continuité de cette interaction (Chanvallon et al., 2010).

### 2.3.3. Principaux facteurs de variation

#### a. *Profondeur de l'anœstrus*

L'efficacité de l'effet bouc pour induire les activités œstriennes et ovulatoires est dépendante de la profondeur de l'anœstrus des femelles. Cette profondeur peut être appréciée, dans un troupeau, par le pourcentage de chèvres qui ovulent spontanément avant l'introduction des boucs, comme cela a déjà été proposé chez la brebis (Lindsay and Signoret, 1980).

Chez la chèvre Créole, qui est une race dessaisonnée, le délai entre l'introduction des boucs et la première ovulation est moins long (1,8 j) pendant l'anœstrus léger (moins de 50 % de chèvres anovulatoires), que pendant l'anœstrus profond (3,3 j) (Chemineau, 1983). La profondeur d'anœstrus réduit également la fréquence d'induction de l'œstrus à la première ovulation et augmente le pourcentage de cycles ovariens courts. Plus l'anœstrus est profond, plus la fréquence des ovulations silencieuses est élevée et plus l'incidence de cycles ovariens courts est élevée.

Chez la chèvre laitière française, une augmentation de la profondeur de l'anœstrus est probablement responsable du retard de la première ovulation après l'introduction du bouc chez certaines chèvres. La première ovulation est survenue seulement 7 à 9 jours après l'introduction des mâles, avec l'expression d'un cycle court et après une deuxième ovulation. Cette réponse retardée provoque l'apparition d'un pic inhabituel d'ovulations 12-14 jours après l'introduction des mâles (Ricordeau et al., 1984).

Une grande variabilité semble exister quant à la présence d'un comportement d'œstrus après l'introduction des mâles. Toutefois, dans quelques publications, l'absence de données concernant l'activité ovulatoire ne permet pas de savoir si le délai observé dans l'apparition de l'œstrus est dû à une augmentation des ovulations silencieuses ou à un accroissement du délai de réponse au mâle (Chemineau, 1987).

Généralement, quand l'anœstrus est trop profond, l'effet bouc ne réussit pas à induire des ovulations. Cependant, aucune étude n'a rapporté une absence totale de réponse. En effet, en contre saison, ce sont des mâles peu actifs qui sont utilisés sur des femelles en anœstrus profond, et il est ainsi difficile de connaître les parts respectives du mâle et de la femelle qui peuvent être en cause ou responsables de cette absence ou faiblesse de réponse.

*b. Intensité de stimulation*

La meilleure réponse des femelles à l'effet bouc est obtenue lorsque les deux sexes sont en contact physique complet (Delgadillo et al., 2006).

Chez la race Saanen, lors d'une lutte en Mai, la stimulation des chèvres avec des boucs sexuellement actifs mais séparés par un couloir (= stimulation faible), diminue le pourcentage de chèvres qui ovulent 14 jours après l'introduction des boucs (15%), comparé avec un contact direct (88 %; Chemineau, 1989).

De même, chez la chèvre Angora, la qualité de la stimulation par les mâles peut modifier, lors d'une lutte en Septembre, le pourcentage de femelles qui ovulent 14 jours après l'introduction du mâle. Sur 85 chèvres séparées des boucs par une barrière 41 % ovulent, comparé à 69 % pour les chèvres en contact direct avec les boucs (Shelton, 1980).

Le sex-ratio est également un facteur susceptible de modifier la réponse des chèvres. Même lorsque toutes les chèvres Créoles ovulent peu de temps après l'introduction des boucs sexuellement actifs, une augmentation du nombre de mâles de 6 à 29 pour 100 femelles permet aux femelles de manifester un bon comportement sexuel et accroît le taux d'ovulation (estimé par le nombre de corps jaunes observé par échographie) de 1,8 à 2,6 (Delgadillo et al., 2006).

*c. Séparation préalable entre les sexes et durée de contact*

Veliz et al. (2002) ont constaté que l'isolement préalable des chèvres anovulatoires des boucs n'est pas nécessaire pour obtenir l'effet mâle. Cependant, des boucs sexuellement actifs doivent être utilisés au moment de la lutte.

La relation entre la durée du contact et l'efficacité de la stimulation est évidente chez les chèvres. L'introduction et le maintien des mâles pendant 16 heures par jour et sur une période de 10 jours a permis d'induire l'ovulation chez 19% des chèvres (Walkden-Brown et al., 1993). Rivas-Muñoz et al. (2007) ont rapporté que 95% des chèvres ont ovulé en réponse à l'utilisation des boucs sexuellement actifs, tandis que 15% seulement ont répondu aux mâles inactifs, ce qui indique que, chez les chèvres, la réponse à l'effet bouc dépend de l'interaction entre l'activité sexuelle du mâle et la durée de contact quotidienne.

En outre, il est intéressant de noter que la proportion des femelles en œstrus ne diffère pas suivant que les femelles sont en contact continu ou discontinu avec les mâles sexuellement actifs (Rivas-Muñoz et al., 2007). Il apparaît que la durée quotidienne de contact des chèvres avec les boucs sexuellement actifs pourrait être réduite. Une étude de Chemineau (1989) a montré que 4h/j de contact avec des mâles sexuellement actifs pendant 15 jours est largement suffisante pour induire un œstrus comportemental chez plus de 80% des femelles.

d. *Saisonnalité et race*

L'efficacité de l'effet mâle à induire une ovulation chez des chèvres en anœstrus saisonnier varie selon la latitude et en fonction de l'intensité de l'inhibition par la photopériode. Il en résulte que l'effet mâle seul peut être efficace toute l'année près de l'équateur (comme la race Créole en Guadeloupe) au lieu d'être efficace seulement avant ou après la saison sexuelle chez les races très saisonnières originaires de climats tempérés (Meyer and Teinkam, 2010).

Dans les zones de latitude moyenne (36-38 °N), la race Murciano granadina réagit complètement à l'effet mâle (Díaz Delfa et al., 2002), alors que chez la race Payoya, les boucs doivent être exposés à une photopériode longue artificielle avant, et avoir ensuite un contact quotidien avec les chèvres pour induire une activité ovarienne (ovulation silencieuse) pendant la saison d'anœstrus (Zarazaga et al., 2011).

Ainsi, la race et la latitude sont des facteurs qui déterminent dans quelle mesure l'effet mâle peut fonctionner.

En résumé, chez les races très saisonnières, l'effet mâle semble devoir être associé à un traitement complémentaire pour être efficace au milieu de la période d'anœstrus saisonnier (Pellicer-Rubio et al., 2007).

2.3.4. Le traitement photopériodique des boucs

La manipulation de la photopériode est le moyen le plus simple pour stimuler l'activité sexuelle chez le mâle, contribuant ainsi à assurer son efficacité pour induire et synchroniser l'activité sexuelle des chèvres pendant le repos sexuel (Chemineau et al., 1992a).

Un traitement photopériodique consiste à une alternance de jours longs et de jours courts. Dans l'hémisphère Nord, à partir du 1er novembre les animaux sont soumis à 2,5 mois de jours longs (16h de lumière par jour fournie par un éclairage artificiel) afin de les préparer pour répondre aux effets stimulants des jours courts par la suite (8 heures de lumière par jour) (Chemineau et al., 2008).

Dans les conditions de terrain, les effets de jours courts sont fournis à travers des journées naturelles, artificielles ou facilement par deux applications sous-cutanées d'implants de mélatonine (18 mg chacun) induisant ainsi une activité sexuelle intense pendant la saison de non reproduction (Delgadillo et al., 2001). Delgadillo et al. (2002) ont rapporté que la proportion de femelles présentant un comportement œstral après l'introduction de mâles, en mars, était significativement plus élevée dans le groupe de chèvres exposées aux mâles sexuellement actifs (qui ont subi un traitement photopériodique) que chez celles exposées à des mâles non traités (100% *versus* 10% respectivement).

Des résultats similaires ont été obtenus en avril; alors que la plupart des femelles (95%) en contact avec les mâles photo-stimulés présentaient un comportement œstral, seulement 15% des chèvres exposées aux mâles non traités ont présenté un œstrus (Rivas-Muñoz et al., 2007). Cependant, en mai et juin, les proportions de chèvres montrant un comportement œstral après introduction des mâles étaient élevées (> 85%) et non différentes suivant que les boucs aient été traités ou non (Carrillo, 2006).

Des résultats similaires ont été rapportés chez la race Murciano granadina (Díaz Delfa et al., 2002); la plupart des chèvres ont présenté un comportement œstral (87%) et ont ensuite mis bas (75%) lorsqu'elles ont été exposées aux mâles en avril-mai. Cette réponse pourrait être due au comportement sexuel intense des mâles de cette race chez lesquels l'activité sexuelle commence en mai-juin (Roca et al., 1992).

Ces résultats montrent que les mâles sexuellement actifs sont particulièrement efficaces pour stimuler l'activité sexuelle des chèvres pendant la saison d'anœstrus et suggèrent que l'intensité du comportement sexuel des mâles pourrait être un facteur important limitant l'efficacité de l'effet mâle.

#### 2.3.5. Traitements hormonaux combinés à l'effet bouc

Afin d'augmenter son efficacité, l'effet mâle peut être associé à d'autres traitements complémentaires. En effet, pour augmenter la synchronisation des ovulations fertiles, et même pour réduire la fréquence des cycles œstraux courts, un traitement progestatif peut être appliqué avant ou en même temps que l'introduction de boucs (Chemineau et al., 2006).

Dans leur étude, Véliz et son équipe (2009) ont observé que l'utilisation de la progestérone sous forme d'une injection unique (5mg) peut accélérer la réponse des chèvres à l'effet bouc en saison d'anœstrus sexuel. Au cours des cinq premiers jours d'exposition aux boucs, le pourcentage des chèvres en œstrus était 70% plus élevé chez les femelles traitées par la progestérone que chez celles non traitées. Au 10ème jour, des pourcentages similaires des chèvres en œstrus et par la suite un taux de gestation similaire ont été observés dans les deux groupes. L'intervalle entre l'introduction du bouc et l'apparition de l'œstrus a été réduit de 4 jours chez le groupe ayant reçu une injection de progestérone.

Chez la race Murciano granadina, Díaz Delfa et ses collaborateurs (2002) ont trouvé que l'effet bouc combiné à une injection de progestérone (25 mg) permet d'améliorer la synchronisation et la prolificité des chèvres. De même, l'injection de 20 mg de progestérone au moment de l'introduction des boucs a augmenté la proportion de femelles en œstrus et le taux d'ovulation observé chez les chèvres locales en Tunisie (Lassoued et al., 1995).

Une synchronisation des chaleurs au moyen d'éponges imprégnées de progestagènes (FGA, 45 mg) en plus de l'effet mâle a amélioré aussi les résultats de fertilité et la taille de portée par rapport à l'effet mâle seul chez la race créole en période d'anœstrus saisonnier (Chemineau, 1985).

Dans le but de pratiquer des IA, Lopez-Sébastien et son équipe (2007) ont évalué l'efficacité du traitement IMA.PRO2 pour induire et synchroniser l'ovulation chez la race Murciano granadina en anœstrus saisonnier (avril-juin). Ce traitement consiste en une injection d'une dose unique de progestérone (25 mg) au moment de l'introduction du bouc, suivie après 9 jours d'une injection de 75 µg de PGF2α. Un comportement d'œstrus a été observé chez 87,5% des chèvres 37 h après l'injection de PGF2α, suivi 3 h après par un pic de LH. En comparant l'utilisation de ce traitement avec le traitement hormonal classique (FGA pendant 11j avec 350 UI d'eCG et 75 µg de PGF2α injectées 48h avant le retrait d'éponge) et après une IA à temps fixe, un taux de gestation plus élevé a été observé chez les chèvres soumises au traitement IMA.PRO2 (65,2%) par rapport aux chèvres soumises au traitement classique (49,4%). Par conséquent, bien que l'utilisation de l'effet bouc en association aux traitements

hormonaux constitue une étape de préparation et de travail supplémentaire en amont d'une IA, elle semble prometteuse en terme d'efficacité, tout en réduisant les traitements hormonaux.

## ***Chapitre II. Objectifs, matériel et méthodes***

## **1. Objectifs de la recherche**

La race Beni Arouss connue comme la race locale de la région du Nord du Maroc est une race saisonnière caractérisée chez la femelle, par une période d'œstrus saisonnier qui va d'Avril à Juin. Cette ressource locale, malgré la variabilité qui existe entre les animaux, a des bons potentiels de production qui s'améliorent en passant d'un système extensif à intensif (Chentouf, 2007). Elle est connue par une bonne adaptation aux milieux difficiles ainsi que par sa résistance aux maladies.

L'introduction de ressources génétiques exogènes bien que productive, pose un problème d'adaptation aux conditions du milieu et met le maintien et le développement des races locales en péril. Pour ceci, la race Beni Arouss a fait l'objet d'un programme d'amélioration génétique qui vise à préserver et améliorer sa productivité.

Aujourd'hui et à travers tous ses avantages, l'IA est largement utilisée pour intensifier la production dans le cadre des programmes d'amélioration génétique de races locales. Toutefois, son application nécessite de répondre à un certain nombre d'interrogations pour mettre au point les outils et les techniques de reproduction adaptés à la race en question et qui peuvent accompagner le projet de création d'un centre d'IA.

Dans ce contexte, cette recherche vise quatre objectifs :

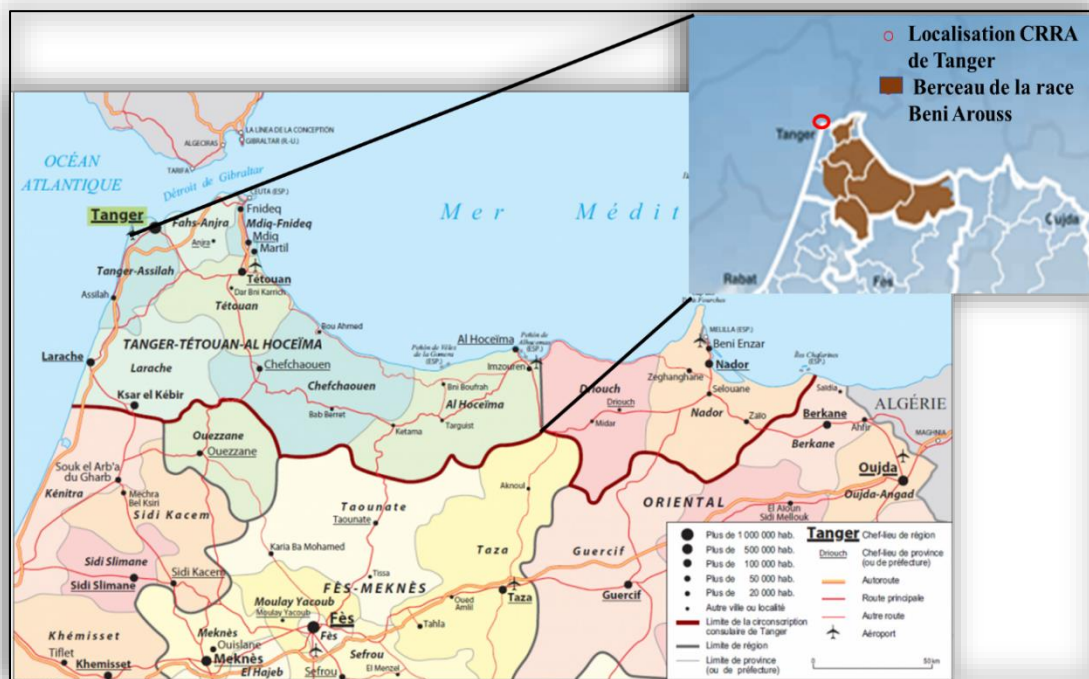
- Etudier la variation saisonnière de l'activité de reproduction chez les boucs Beni Arouss.
- Caractériser la conservation et étudier l'influence de la saison sur l'aptitude de conservation à l'état liquide de la semence chez le bouc Beni Arouss.
- Comparer l'efficacité de protocoles dit « classiques » d'induction, de synchronisation d'œstrus et d'ovulation chez la chèvre Beni Arouss.
- Tester l'efficacité d'un protocole alternatif d'induction, de synchronisation d'œstrus et d'ovulation chez la chèvre Beni Arouss.



## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Zone d'étude

Toutes les études réalisées dans le cadre de la présente recherche ont été menées au niveau du



Centre Régional de la Recherche Agronomique de Tanger (CRRAT).

Figure 7. Localisation du CRRAT de Tanger par rapport au berceau de la race Beni Arouss.

Dans cette région, le climat est sub-humide avec une pluviométrie moyenne annuelle de 887 mm, concentrée entre les mois d'Octobre et Avril. La température annuelle moyenne est de 19 °C, avec une température minimale moyenne du mois le plus froid de 9,6 °C et une température maximale moyenne du mois le plus chaud de 27,9 °C.

Sous les latitudes du Nord du Maroc (36°N), la photopériode varie entre 10 h durant le solstice d'hiver et 14 h 45 min durant le solstice d'été.

Le centre de Tanger dispose de deux domaines expérimentaux : la chèvrerie expérimentale de Bougdour (35°39'N, 5°54'O) où les chèvres sont élevées en conduite semi-intensive sous photopériode naturelle, et le domaine expérimental de Boukhalef (35°44'N, 5°54'O), situé à peu près 20 km de la chèvrerie.

Les recherches sur les femelles ont été conduites au niveau de la chèvrerie, alors que celles sur les boucs ont été réalisées au niveau du 2ème domaine de recherche qui dispose d'un laboratoire de reproduction animale destiné à l'analyse de la qualité et à la conservation de la semence caprine ainsi que pour les dosages hormonaux. Juste à côté, les boucs sont élevés dans des boxes individuels sous conditions naturelles de photopériode.

## **2.2. Animaux et conduite alimentaire**

Construite sur une superficie totale de 700 m<sup>2</sup>, la station de recherche de Bougdour dispose d'un troupeau de 100 chèvres et leurs suites qui fait l'objet d'essais en matière de reproduction, nutrition et génétique caprine.

La superficie globale de la chèvrerie est de 473 m<sup>2</sup> dont 229 m<sup>2</sup> sont réservés à l'aire de repos pour les chèvres reproductrices. Cet espace est divisé en 8 boxes de 29 m<sup>2</sup> disposant chacun d'un abreuvoir automatique et de cornadis autobloquants. Les chèvres sont âgées en moyenne de 5 ans avec un poids moyen de 30 kg et elles ont été suivies de 2014 à 2018.

Le troupeau caprin de la station de Bougdour pâture quotidiennement en moyenne 4 heures. Au retour à la chèvrerie, les animaux du troupeau reçoivent une ration à base de foin d'orge et d'un aliment concentré composé de féverole, orge et maïs. Les rations sont distribuées pour répondre aux besoins des animaux en fonction de leur stade physiologique et sur la base des recommandations de l'INRA (1988).

Au niveau de la station, les animaux ont accès libre à l'eau et aux blocs à lécher afin d'assurer l'apport en minéraux.

Par ailleurs, le centre dispose de 7 boucs âgés entre 5 et 8 ans et dont le poids varie entre 28 et 67 kg. Ces animaux sont conduits séparément des femelles dans des boxes individuels au niveau du domaine expérimental de Boukhalef. Deux chèvres sont gardées au niveau du domaine pour servir lors des récoltes de la semence. Les boucs reçoivent une ration à base de foin d'orge et d'un aliment concentré composé de féverole, orge et maïs, distribué sur la base des recommandations de l'INRA (1988) avec un accès libre à l'eau.

## **2.3. Protocole expérimental**

Afin d'étudier l'effet de la saison sur le comportement sexuel, les mensurations testiculaires et les caractéristiques de la semence chez les boucs Beni Arouss (Etude 1), les sept boucs de la station ont été utilisés. L'étude a été conduite entre mars 2015 et février 2016, à la station expérimentale de Boukhalef.

En parallèle, la deuxième étude relative à l'étude de l'effet de la saison sur l'aptitude de conservation à l'état liquide de la semence a été réalisée (Etude 2). En effet, après avoir analysé la qualité de la semence fraîche (dans la 1ère étude), cette dernière a été conservée après dilution, à 16°C et pendant 24h afin d'être contrôlée pour la variation de sa qualité après 4, 8 et 24 h de conservation.

En avril de la même année, durant la saison d'œstrus saisonnier chez la chèvre Beni Arouss, l'étude de l'effet de huit traitements hormonaux classiques sur l'induction et la synchronisation de l'œstrus et de l'ovulation chez la chèvre en vue de l'IA a été réalisée, au niveau de la chèvrerie, sur un nombre total de 63 chèvres acycliques (Etude 3, œstrus saisonnier).

Sept mois après, et au cours de la saison sexuelle chez la chèvre Beni Arouss, la même étude a été réalisée chez des chèvres cyclées (Etude 3, saison sexuelle).

Selon la disponibilité en animaux au niveau du centre, et étant donné que 14 chèvres ont été détectées acycliques pour des raisons inconnues au cours de l'essai ce qui a nécessité leur écartement, un effectif total final de 44 chèvres a été utilisé.

En avril 2017, la dernière étude portant sur l'effet du remplacement de l'eCG par l'effet bouc sur l'induction et la synchronisation de l'œstrus et de l'ovulation chez la chèvre Beni Arouss a été réalisée sur un effectif total de 43 chèvres acycliques conduites en séparation des mâles à la chèvrerie (Etude 4, Anœstrus saisonnier). Une comparaison entre le meilleur traitement classique, résultat de la 3ème étude et de deux autres traitements basés sur l'utilisation de l'effet de boucs sexuellement actifs a été effectuée.

Sachant que le printemps correspond à la saison de plus faible reproduction chez les boucs Beni Arouss en comparaison avec l'été et l'automne (résultats de l'étude 1), un traitement photopériodique a été réalisé au préalable afin de stimuler l'activité sexuelle chez les boucs. A partir du 14 novembre 2016, au niveau du domaine expérimental de Boukhalef, quatre boucs ont été soumis à un traitement de jours longs (16h de lumière par jour) pendant 75 jours (jusqu'à 28 janvier 2017). Ensuite, ils ont été exposés aux conditions naturelles de photopériode jusqu'à la fin de l'étude.

Finalement, en saison sexuelle (novembre 2017), la 2ème partie de la dernière étude a été réalisée, en testant l'effet des mêmes traitements sur la synchronisation d'œstrus et d'ovulation chez 45 chèvres cycliques toujours maintenues en séparation des mâles au moins un mois avant l'essai.

La figure suivante illustre le calendrier des différentes études :

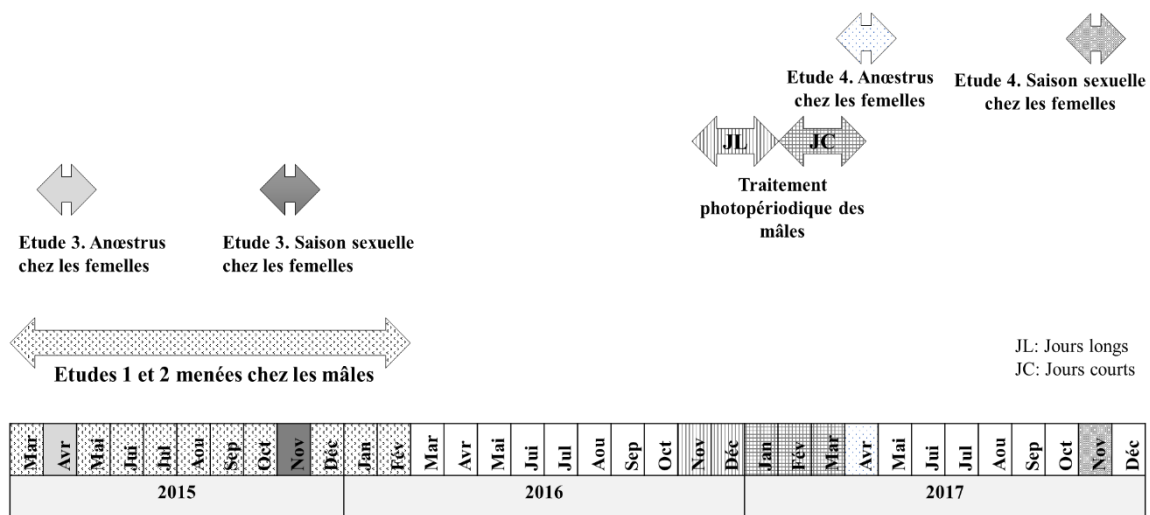


Figure 8. Calendrier des différentes recherches

## 2.4. Les principales techniques utilisées en complément des méthodes dites « classiques »

Deux techniques principales d'analyse ont été utilisées durant les quatre années de recherche. La première est l'analyse du sperme assistée par ordinateur ou le CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), utilisée pour évaluer la qualité de la semence chez les boucs et la deuxième

technique est la méthode immuno-enzymatique (ELISA) utilisée pour effectuer les dosages d'hormones spécifiques pour les deux études chez la femelle.

#### 2.4.1. Analyse du sperme assistée par ordinateur (CASA)

Le centre régional de Tanger dispose d'un système CASA (ISAS, proiser R+D SL, Espagne) qui permet l'analyse assistée par ordinateur de certains paramètres spermatiques. Ce système fonctionne grâce à une caméra couplée à un microscope et utilise un logiciel informatique permettant l'analyse des trajectoires des spermatozoïdes. Cette technique a permis une certaine standardisation de l'analyse de la semence notamment au niveau du même laboratoire (Verstegen et al., 2002), pourtant certains paramètres doivent être interprétés avec précaution. Le système peut évaluer la concentration en spermatozoïdes du sperme, néanmoins, cette fonction peut conduire à une surestimation du nombre de spermatozoïdes. En effet, le système CASA ne peut pas faire la différence entre les débris cellulaires qui ont une taille semblable à celle des spermatozoïdes et les têtes de spermatozoïdes (Sharon et Mortimer, 2000). De plus en cas de faible concentration du sperme, les valeurs fournies ne sont pas fiables (Verstegen et al., 2002). Pour ces raisons, la détermination de la concentration du sperme avec ce système n'est pas recommandée.

Cependant, en fonction de l'espèce le système fournit des données intéressantes sur la motilité des spermatozoïdes (Mwaanga et al., 2014). Ainsi, en plus de la motilité totale (MT) et progressive (MP), des valeurs cinématiques sont déterminées pour chaque spermatozoïde, comme par exemple la VCL (Curvilinear Velocity) qui reflète la distance totale que couvre la tête du spermatozoïde au cours de la période d'observation. La VSL (Straight-Line Velocity) est déterminée par la mesure de la distance entre le point d'arrivée et le point de départ, en ligne droite, la VAP (Average Path Velocity) correspond à la distance parcourue sur le trajet moyen pendant la durée d'observation, l'ALH (Amplitude of Lateral Head displacement) qui correspond à l'amplitude de déplacement latéral de la tête et la BCF (Beat Cross Frequency) qui mesure la fréquence de croisement de trajectoire (Fig. 8). D'autres paramètres sont également mesurés et qui correspondent aux rapports entre les vitesses à savoir la linéarité ( $LIN = VSL/VCL$ ), l'oscillation ( $WOB = VAP/VCL$ ) et la rectitude ( $STR = VSL/VAP$ ). Suivant des études réalisées chez les taureaux et les béliers, ces paramètres peuvent être utilisés pour prédire la fertilité (Cox et al., 2006 ; Kathirvan et al., 2008 ; Del Olmo et al., 2013). En effet, ils facilitent l'identification des modifications de trajectoires et des battements flagellaires liés à l'hyperactivation comme une partie importante de la capacitation du sperme (Suarez et Pacey, 2006). Une augmentation de la VCL et de l'ALH indique une hyperactivation chez plusieurs espèces (McPartlin, 2009 ; Mortimer et Mortimer, 2013).

Chez les caprins, les critères considérés par le système pour l'analyse d'images de spermatozoïdes sont les suivants : nombre d'images (25/s), optiques (Ph-), échelle (20xOlympus), surface des particules (entre 3 et 70  $\mu m^2$ ), spermatozoïde lent (VCL entre 10 et 45  $\mu m/s$ ), moyen (VCL entre 45 et 75  $\mu m/s$ ), rapide (VCL > 75  $\mu m/s$ ), progressivement motile ( $STR > 80\%$ ) (Cox et al., 2006, Berlinguer et al., 2009).

En outre, le système CASA après avoir réalisé une coloration des spermatozoïdes, permet une évaluation objective de la morphométrie de la tête (Mwaanga et al., 2014). Ainsi, les dimensions de la tête peuvent être déterminées.

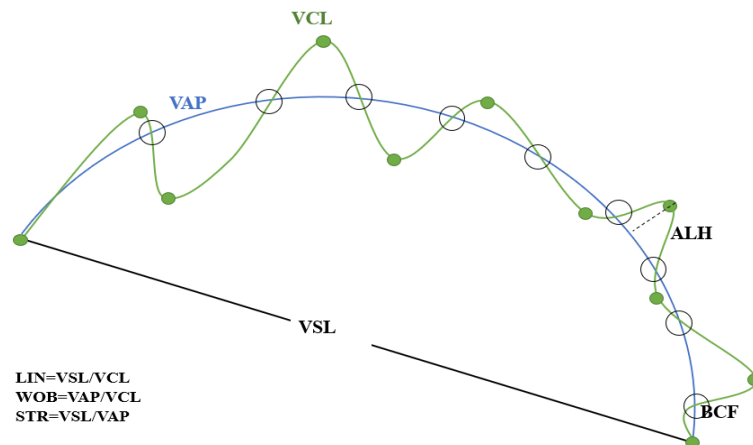


Figure 9. Paramètres de motilité mesurés par le système CASA.

#### 2.4.2. La méthode immuno- enzymatique (ELISA)

Afin de déterminer le moment du pic préovulatoire de la LH et caractériser l'activité ovulatoire de la femelle dans les études menées chez la chèvre Beni Arouss, des dosages des concentrations plasmatiques de la LH et de la progestérone ont été réalisés par la méthode ELISA au niveau du laboratoire de reproduction animale à l'INRA de Tanger. En effet, le laboratoire dispose d'un lecteur et d'un laveur de microplaques automatique pour faire les dosages dans les bonnes conditions.

Deux kits commerciaux ont été utilisés pour déterminer les concentrations de ces deux hormones. Le premier est le kit LH-Detect pour caprins (Repropharm, INRA, France), destiné à un dosage enzymatique quantitatif de type ELISA sandwich de la LH. Ce kit est choisi sur base de sa spécificité ainsi que pour son excellente sensibilité.

Le deuxième est un kit de dosage de la progestérone humaine (DSI-EIA-Steroid-Progesterone, DSI, Italie) destiné à un dosage enzymatique quantitatif de type EIA compétitif direct de la progestérone. Ce kit, très peu onéreux par rapport aux kits spécifiquement développés pour petits ruminants, est validé pour usage chez la femme mais a pu être adapté, au moyen d'une série de pré-tests, à la chèvre où le seul objectif était la mise en évidence d'une phase lutéale au cours d'un suivi temporel des chèvres. Ces dosages n'étaient pas destinés à déterminer avec précision une concentration plasmatique en progestérone.

Après 2016, la commercialisation de ce kit a été transférée à une autre firme sous un nouveau nom commercial (abia progesterone, AB Diagnostic Systems GmbH, Allemagne). Néanmoins, le kit a gardé les mêmes caractéristiques ainsi que la même performance permettant son utilisation pour les derniers dosages.

### ***Chapitre III. Présentation des études (sous forme d'articles)***

## ***Etude 1. Variation saisonnière de l'activité de la reproduction chez les boucs Beni Arouss***

Cette étude est présentée sous forme d'article publié dans le journal Animal Reproduction Science (El Kadili, S., Raes, M., Bister, J.L., Archa, B., Chentouf, M., Kirschvink, N., 2019. Effect of season on sexual behavior, testicular measurements and seminal characteristics in "Beni arouss" North Moroccan bucks, Anim. Reprod. Sci. 201, 41-54).

**Effect of season on sexual behaviour, testicular measurements and seminal characteristics in "Beni Arouss" North Moroccan bucks**

**Sara El Kadili<sup>1,2</sup>, Marianne Raes<sup>1</sup>, Jean-Loup Bister<sup>1</sup>, Bouchaib Archa<sup>2</sup>, Mouad Chentouf<sup>3</sup>, Nathalie Kirschvink<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *University of Namur, Faculty of Sciences, Department of Veterinary Medicine, Integrated Veterinary Research Unit, Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium. Email (corresponding author): nathalie.kirschvink@unamur.be*

<sup>2</sup> *Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès, Department of Animal Production, Route Haj Kaddour, BP. S/40, 50001 Meknes, Morocco. Email (corresponding author): s.elkadili@gmail.com*

<sup>3</sup> *Institut National de la Recherche Agronomique, Regional Center of Tangier, Bd Sidi Mohamed Ben abdellah78, 90010 Tangier, Morocco.*



## **Présentation de l'étude**

Chez les petits ruminants, l'insémination artificielle gagne en popularité depuis plusieurs années surtout dans le but d'améliorer la génétique des troupeaux. Néanmoins son application nécessite une étude préalable de la variation saisonnière de l'activité de reproduction. Pour ceci, et au cours d'une année, un suivi mensuel des mensurations testiculaires, du comportement sexuel et des caractéristiques de la semence chez sept boucs de la race Beni Arouss, maintenus à 35°N de latitude sous conditions naturelles de photopériode a été réalisé. Des mensurations mensuelles de la circonférence scrotale (par mètre ruban), du diamètre et de la longueur testiculaire (par pied à coulisse) ont été réalisées. Le comportement sexuel a été évalué suite à l'exposition des mâles à une femelle en œstrus. Le nombre d'éjaculats récoltés à l'aide d'un vagin artificiel, le nombre de sauts et le temps de réaction pour deux éjaculations ont été déterminés. Pour un premier éjaculat, le volume du sperme, la concentration (par comptage dans la cellule de Bürker), la viabilité (après coloration par éosine-nigrosine) et la morphologie des spermatozoïdes (après coloration par Diff-Quik) ont été analysées. Les paramètres de motilité et de morphométrie de la tête ont été analysés en utilisant le système CASA.

Les résultats ont montré que la taille testiculaire varie significativement en fonction de la saison. Les valeurs les plus élevées ont été enregistrées en été et en automne pour la circonférence scrotale, et les plus basses en hiver pour la longueur testiculaire. La plupart des caractères liés au comportement sexuel n'ont pas été influencés par la saison, à l'exception du nombre de sauts avant la première éjaculation qui était plus faible en été. Aucune différence entre les saisons n'a été observée en terme de volume de l'éjaculat. Cependant, la concentration en spermatozoïdes, la viabilité et le pourcentage de spermatozoïdes normaux ont été inférieurs pendant la saison hivernale. La taille des têtes de spermatozoïdes a été significativement plus grande en automne et l'activité des spermatozoïdes a été accrue en été et en automne. L'analyse des corrélations a montré que la majorité des caractéristiques séminales conventionnelles sont significativement corrélées avec les mensurations testiculaires ( $P < 0,05$  ;  $r < 0,5$ ). Les paramètres conventionnels et ceux de motilité générés par le CASA ont montré des corrélations positives entre la viabilité et la motilité progressive ( $r = 0,4$  ;  $P < 0,05$ ) et entre le pourcentage des spermatozoïdes normaux et les vitesses progressive linéaire (VSL) et (VAP) ( $r = 0,4$  ;  $P < 0,05$ ). Un score global et individuel de performance reproductive a été établi pour permettre d'évaluer l'amplitude de variation de l'aptitude de reproduction de chaque individu. Ce score a confirmé que pour l'ensemble des boucs, une amélioration de la performance de reproduction a été enregistrée en été et en automne.

Cette étude décrit pour la première fois la variation saisonnière de l'aptitude de reproduction des boucs de la race Beni Arouss et suggère que, malgré qu'une performance de reproduction maximale a été notée en été et en automne, la reproduction peut être possible tout au long de l'année.

## **ABSTRACT**

Changes in anatomical, behavioural and seminal characteristics were measured throughout the year in seven Beni Arouss bucks maintained at a latitude of 35°N. Testicular size varied significantly. There were the greatest values during the summer and autumn for scrotal circumference and least in the winter for testicular length. Values for most variables related to sexual behavior were not affected by season except the number of mounts before first ejaculation which was least in the summer. No differences were detected between seasons in terms of semen volume. The sperm concentration, viability and percentage of normal sperm, however, were less during the winter period. The size of sperm heads was larger in the autumn and motility of spermatozoa was greater in the summer and autumn. Results from the correlation analysis indicated that the majority of conventional seminal characteristics were correlated with testis measurements ( $P < 0.05$ ;  $r < 0.5$ ). Values for conventional and CASA motility variables indicated there were positive correlations between viability and progressive motility ( $r = 0.4$ ;  $P < 0.05$ ) and between the percentage of normal sperm and straight line and average path velocity ( $r = 0.4$ ;  $P < 0.05$ ). A global reproduction performance score was established for each buck, which allowed for assessment of magnitude of seasonal changes for each individual. These global score values indicated there was a greater reproductive performance for all bucks during summer and autumn. This study described for the first time seasonal variations of reproductive characteristics of Beni Arouss bucks and results indicate that even though there is a maximal capacity for reproductive performance during the summer and autumn, breeding should be possible throughout the year.

**Keywords:** Season; Testicular size; Sexual behaviour; Seminal characteristics; Beni Arouss buck

## **1. Introduction**

The productivity of small ruminants is affected by seasonality of reproduction. For goats, sexual behaviour, testicular size and semen quantity and quality are the main factors that affect buck reproductive efficiency during the year. This efficiency varies as a result of various factors including breed (Perez and Mateas, 1996; Arrebola and Abecia, 2017), latitude (Karagiannidis et al., 2000; Gómez-Brunet et al., 2012), climate (Zarei et al., 2009), season (Talebi et al., 2009; Zarazaga et al., 2009; Arrebola and Abecia, 2017), nutrition (Walkden-Brown and Bocquier, 2000; Martin et al., 2010) and circulating gonadotropin concentrations (Yu et al., 2018).

In the Northern hemisphere (at 30-40°N) season of the year was reported as the main factor affecting semen characteristics in goats with maximum reproductive functions occurring in the summer and autumn when natural photoperiods exist (Barkawi et al., 2006; Zamiri and Heidari, 2006; Talebi et al., 2009). In the southern hemisphere and for breeds from the lower latitudes in the Mediterranean area (36-38°N), bucks still have maximum reproductive activity in summer and autumn but variations are not as pronounced as those when animals are located in other parts of the world (Arrebola et al., 2010; Chentouf et al., 2011; Arrebola and Abecia, 2017).

In Morocco, goats account for 6.1 million among the 28.6 million livestock (MAPM, 2017) and are bred in mountainous and isolated areas. In Northern Morocco, the goat herds constitute approximately 788,000 animals. Beni Arouss is a North Moroccan indigenous goat breed that has been officially recognized recently with approximately 8,600 animals that have been recorded by the National Association of Sheep and Goats in Morocco (Bouaissa, 2017). This breed is well adapted to extensive management practices and harsh local conditions. Beni Arouss goats are relatively resistant to local pests and diseases. The mean body weight of adult Beni Arouss is  $37.5 \pm 8.8$  kg in females and  $41.8 \pm 13.6$  kg in males with red as predominant coat color for both sexes (Hilal et al., 2013). Goats from this breed are seasonal breeders (Chentouf et al., 2011) with a daily milk production of 0.47 kg/d in extensive systems and 0.51 kg/d when there are intensive management conditions. This difference of productivity seems to be due to the large variability between goats (El Otmani et al., 2014). Because of large-scale dissemination of imported breeds in Morocco, there is a continuous decrease in the number of local breeds of goats. This phenomenon could lead in the future to the total loss of the local breeds and inclusion of the genetics from these autochthonous populations into cosmopolitan breeds (Benjelloun et al., 2015). One of the goals of the Moroccan Agricultural Ministry is to improve herd productivity and preservation of this breed by implementation of a breeding program using artificial insemination. There, however, is little information on the effect of season on buck reproductive characteristics in northern Morocco. The only study of this kind was conducted by Chentouf et al. (2011) and was limited to physical measurements and a few characteristics of semen.

In artificial insemination centers, general sperm characteristics such as concentration, motility, viability and morphology are routinely used to assess semen quality. Inconsistent results regarding the relationship between fertility-related values and these values for conventional sperm quality variables have been reported. Many researchers have reported that there are strong correlations between these types of values (Linford et al., 1976; Rodríguez-Martínez, 2003), while in other studies it was reported there were little or no relationships between ram fertility-based values and those for sperm quality variables (Gadea, 2005; Bishop

et al., 2009). Unfortunately, the methods for performing such analyses lack standardization and, therefore, there cannot be comparisons between operators and laboratories. Computer Assisted Sperm Analysis system (CASA) was developed as a more accurate technique to assess sperm motility and morphometry (Mwaanga et al., 2014). In bulls and rams, results indicated that sperm motility and velocity can be used in predicting fertility (Kathiravan et al., 2008; Del Olmo et al., 2013). The CASA variables have been used also to assess seasonal variation of semen quality in species such as goats (Wang et al., 2015), sheep (Bravo et al., 2014), cattle (Valeanu et al., 2015) and horses (Waheed et al., 2015). Such data are not available for Beni Arouss bucks.

The aim of the present study, therefore, was to evaluate in North Moroccan bucks seasonal variations of sexual behaviour, testicular measurements and seminal characteristics during a 12-month period. A general reproduction performance score was developed that took into account values for all reproductive variables as an attempt to provide information about the magnitude of seasonal reproductive changes in bucks of this breed.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Localization and animal management*

This study was conducted at the experimental station of Boukhalef, INRA, Regional center of Tangier, located at the north of Morocco (35°44'N Latitude, 5°54' O Longitude). The climate in this region is Mediterranean sub-humid with an average annual rainfall of 887 mm. The greatest ambient temperature is 27.9 °C and the least is 9.6 °C. The day length ranges from 10 h during the winter solstice to 14 h 45 min in the summer solstice. During a 12-month period (March 2015 to March 2016), data were collected from seven sexually mature Beni Arouss bucks aged between 5 and 8 years of age, at the onset of the study, with a body weight (BW) ranging between 28 and 67 kg. None of the bucks were in physical proximity with other bucks used in the study. The year was divided into four seasons according to the calendar: spring (from 21 March to 21 June), summer (from 22 June to 21 September), autumn (from 22 September to 21 December) and winter (from 22 December to 20 March). During the experimental period, bucks were subjected to the same barn management. They were maintained indoors in individual pens and with natural photoperiodic conditions. Animals were fed basal diets of oat hay and concentrate feed mixture according to the recommended requirements of INRA (1988) and had free access to water.

### *2.2. Testicular measurements and sexual behaviour*

Scrotal circumference (SC), testicular length (TL) and testicular diameter (TD) were determined monthly. Testis measurements were performed by the same operator using a flexible tape and a caliper.

Sexual behavior was evaluated monthly. Before semen collection, each buck was individually exposed to a female goat in which there was an induced estrus. Reaction time (time to ejaculate) was evaluated for three consecutive ejaculates. The time allocated in which each ejaculation had to occur during an assessment period was 5 minutes. If ejaculation occurred within less than five minutes, a new time interval was calculated for the next ejaculation. In the absence of ejaculation within 5 minutes, a short period of 30 to 45 minutes

during which the buck was separated from the estrous female was imposed either once or twice, and a new assessment period was attempted where the previous 5 (or 10) minutes were added to the time for first ejaculation. The number of mounts before each ejaculation was also recorded.

### *2.3. Semen collection and evaluation*

Semen was collected from each buck monthly using artificial vagina and an estrous goat as a mount. For semen evaluation samples from the first ejaculate were analyzed. Immediately after collection, the semen was transported to the laboratory and immersed into a water bath at 37 °C.

General seminal characteristics assessed in the current study represent conventional variables and these included semen volume, sperm concentration, viability and percentage of normal sperm.

Semen volume was measured in a graduated collection tube and a pre-dilution (v:v) using a synthetic extender prepared in the research laboratory (pH = 7.2 and osmotic pressure = 320 mOsm/kg). Sperm concentration was determined by manual counting with a Burker haemocytometer after diluting an aliquot of semen with a 0.05% formaldehyde distilled water (1:200).

Motility analysis of sperm was performed using a CASA system (ISAS, Proiser R+D SL, Spain). This system consisted of use of an optical phase contrast microscope (UB203i, Proiser R+D SL, Spain) connected to a digital camera and a computer. Prior to analysis, semen sample concentration was adjusted to a  $30 \times 10^6$  spermatozoa/ml with extender. The images were taken from 3 µl semen aliquots, which were placed on a 20 µm deep chamber slide (SpermTrack 20, Proiser R+D SL, Spain) on a pre-warmed stage. At least 200 spermatozoa from six different fields were analyzed in each sample using a negative phase-contrast microscope at 10x magnification. Samples were analyzed to determine values for sperm motility variables within 20 min after collection. Variables included in the analysis were total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), rapid spermatozoa (%), curvilinear velocity (VCL, µm/s), straight line velocity (VSL, µm/s) and average path velocity (VAP, µm/s).

The sperm viability was evaluated by eosin-nigrosin (minutube, Germany) staining according to the method described by Evans and Maxwell (1987). Smears were prepared by mixing 5 µl of eosin (2% solution), 5 µl of nigrosin (4% solution) and 5 µl of semen (diluted at  $800 \times 10^6$  spermatozoa/ml) on a warm slide and immediately spread with another slide. A total of 200 cells from different microscopic fields were evaluated using a bright-field microscope using a 60x objective. Spermatozoa with a partial or complete purple head were considered dead and only unstained spermatozoa were considered to be viable.

Morphometric analysis of sperm samples was performed using the morphometric module of the ISAS. Prior to analysis, smears were prepared by placing 3 µl of the sperm sample previously diluted at  $800 \times 10^6$  spermatozoa/ml on a clean slide. These were subsequently air-dried for 10 min on a warming stage and fixed for 15 s in Diff-Quik (Microptic Automatic diagnostic system, Barcelona, Spain) fixative solution (containing 0.002 g/l of Fast Green in methanol). These samples were subsequently stained with Diff-Quik solution I (contains 1.22 g/l of Eosin Y in phosphate buffer at pH 6.6 and 0.1% (w/v) sodium azide as preservative) for

10 s and then with Diff-Quik solution II (contains 1.1 g/l of Thiazine Dye in phosphate buffer at pH 6.6) for 10 s. After each step, the excess solutions were allowed to drain from the slides by placing them vertically on absorbent paper. Once stained, the slides were rinsed with distilled water, air dried on a warming stage and permanently sealed with Eukitt quick hardening mounting medium (Sigma-Aldrich, Quimica SA., Spain) and a coverslip. Slides were examined using an UB203i microscope, with a x60 bright-field objective. Sperm heads ( $n = 200$  per sample) with no imbrications with other particles were randomly and manually recorded using a software function. The sperm head morphometric dimensions for length ( $\mu\text{m}$ ), width ( $\mu\text{m}$ ), area ( $\mu\text{m}^2$ ) and perimeter ( $\mu\text{m}$ ) were generated by the system software. Data were compiled and stored for further analysis. After morphometric evaluation, a total of 100 spermatozoa per slide and sample were characterized at 60x objective for normal morphology using the procedures previously published by Evans and Maxwell (1987).

#### *2.4. Establishment of a global reproduction performance score for bucks*

An individual score taking into account the seasonal changes of the 22 reproduction performance variables was established as follows: The same five previously described reproduction performance categories were considered (i.e., testicular measurements, sexual behaviour, general semen characteristics, sperm motility and sperm morphometry). To assess relative changes due to seasonality, values recorded during the spring were considered as a reference (100%) and values for assessments for each buck during the following seasons were calculated as a percentage of the spring value for that individual. Relative changes were transformed into negative (reduced reproduction performance) or positive (improved reproduction performance) scores: 0 for changes below 10%; -1 or +1 for changes between 10% and 20 %; -2 or +2 for changes between 20% and 40%; -3 or +3 for changes between 40% and 60%; -4 or +4 for changes greater than 60%. Scores for each performance category were weighted according to a within-category coefficient with the aim being to take into consideration the greater importance of certain variables. Each performance category score was further weighted using a between-category coefficient that allowed for recognizing the greater importance of these variables to general semen characteristics and sperm motility (see Table 1 for details). This global reproduction performance score ranged between -1 and 1.

#### *2.5. Statistical analysis*

Data analysis was performed using SAS 9.0 software (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Before analysis, the percentage data were transformed to arcsine and all data were subjected to ANOVA using Proc mixed of SAS. The statistical model included the fixed effect of season or month and the random effect of buck. Body weight of bucks was added as a co-variate to the model. Least squares means for seasons were compared using the PDIFF option (a pairwise t-test) of the LSMEANS statement of SAS. Data were expressed as mean  $\pm$  SD and the level of significance was set at  $P < 0.05$ . Pearson correlation coefficients among all the variables were also investigated.

**Table 1.** Establishment of a global reproduction performance score aiming to assess seasonal changes of Beni Arouss bucks' reproduction performance

Between-category coefficient of ponderation	Category	Variables	Within-category coefficient of ponderation
0.10	Testicular measurements	Scrotal circumference	2
		Testicular diameter	2
		Testicular length	1
0.15	Sexual behaviour	Number of ejaculates	1
		Number of mounts before 1 <sup>st</sup> ejaculation	1
		Reaction time/first ejaculation	1
		Number of mounts before 2 <sup>nd</sup> ejaculation	1
		Reaction time/second ejaculation	1
0.30	General seminal characteristics	Semen volume	2
		Sperm concentration	3
		Viability	3
		Normal sperm	3
0.30	Sperm motility	TM	1
		PM	1
		Rapid spermatozoa	1
		VCL	1
		VSL	1
		VAP	1
0.15	Sperm morphometry	Length	1
		Width	1
		Area	1
		Perimeter	1

### 3. Results

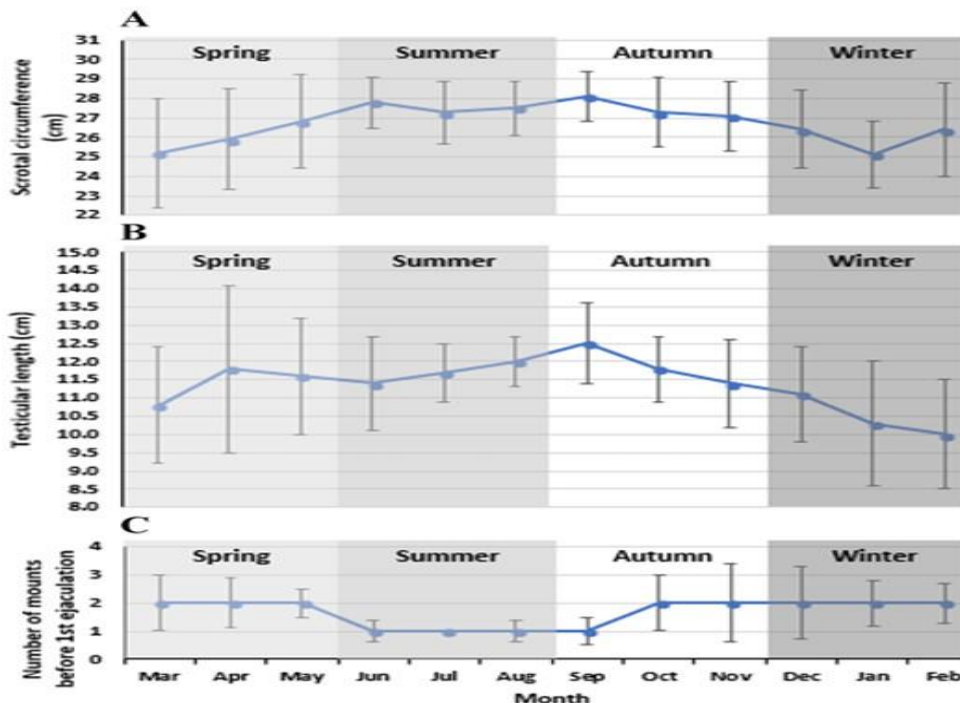
#### 3.1. Testicular measurements and sexual behaviour

Changes in values for testicular variables are shown in Table 2 and Figure 1. Scrotal circumference varied throughout the year and was affected by the bucks' body weight, with the least mean values during the spring and winter ( $26.0 \pm 2.5$  cm and  $26.0 \pm 2.0$  cm, respectively) and the greatest values ( $P < 0.05$ ) during summer and autumn ( $27.5 \pm 1.4$  cm and  $27.5 \pm 1.6$  cm, respectively). There was a slight increase in the testicular diameter during the summer and autumn ( $5.6 \pm 0.5$  cm and  $5.7 \pm 0.5$  cm, respectively) compared with the winter ( $5.4 \pm 0.5$  cm;  $P < 0.05$ ). Testicular length was affected by season and month ( $P < 0.05$ ), being least in the winter ( $10.5 \pm 1.5$  cm) especially in February ( $10.0 \pm 1.5$  cm) compared with all other seasons.

**Table 2.** Effect of season on Testicular measurements in Beni Arouss bucks ( $n = 7$ )

Traits	Season			
	Spring	Summer	Autumn	Winter
Scrotal circumference (cm)	$26 \pm 2.5^b$	$27.5 \pm 1.4^a$	$27.5 \pm 1.6^a$	$26 \pm 2^b$
Testicular diameter (cm)	$5.5 \pm 0.8^{bc}$	$5.6 \pm 0.5^{ab}$	$5.7 \pm 0.5^a$	$5.4 \pm 0.5^c$
Testicular length (cm)	$11.4 \pm 1.8^a$	$11.7 \pm 1^a$	$11.9 \pm 1.1^a$	$10.5 \pm 1.5^b$

Data are shown as mean  $\pm$  SD; Means with different superscript letters in the same row are different; lowercase letters:  $P < 0.05$ ; uppercase letters:  $P < 0.001$ .



**Fig. 1.** Monthly variations in scrotal circumference (A), testicular length (B), testicular diameter (C) and number of mounts before first ejaculation (D) in Beni Arouss bucks; Data are shown as mean  $\pm$  SD ( $P < 0.05$ ).



Due to rare occurrences of third ejaculations, only data related to the first and second ejaculation were analyzed (Table 3). Values for most variables related to sexual behavior (number of ejaculates, time for first ejaculation, number of mounts before the second ejaculation and reaction time per second ejaculation) were neither affected by season ( $P > 0.05$ ), nor body weight. In the 3 months of the summer and in September (Fig. 1) there, however, was a decrease in the number of mounts before occurrence of the first ejaculation ( $P < 0.001$ ), where most bucks ejaculated after one mount in comparison with there being two mounts before ejaculation in the other seasons of the year. The greatest libido of the bucks was, therefore, observed in the summer and early autumn.

**Table 3.** Effect of season on sexual behavior in Beni Arouss bucks ( $n = 7$ )

Traits	Season			
	Spring	Summer	Autumn	Winter
Number of ejaculates	$1.6 \pm 0.6$	$1.7 \pm 0.6$	$1.9 \pm 0.3$	$1.7 \pm 0.5$
Number of mounts before first ejaculation	$2 \pm 0.8^A$	$1 \pm 0.3^B$	$2 \pm 1.1^A$	$2 \pm 0.9^A$
Reaction time/first ejaculation (s)	$147 \pm 223$	$114 \pm 157$	$75 \pm 38$	$70 \pm 61$
Number of mounts before second ejaculation	$2 \pm 1.7$	$1 \pm 0.8$	$1 \pm 0.8$	$1 \pm 0.6$
Reaction time/second ejaculation (s)	$318 \pm 217$	$336 \pm 177$	$386 \pm 80$	$347 \pm 94$

Data are shown as mean  $\pm$  SD; Means with different superscript letters in the same row are different ( $P < 0.001$ ).

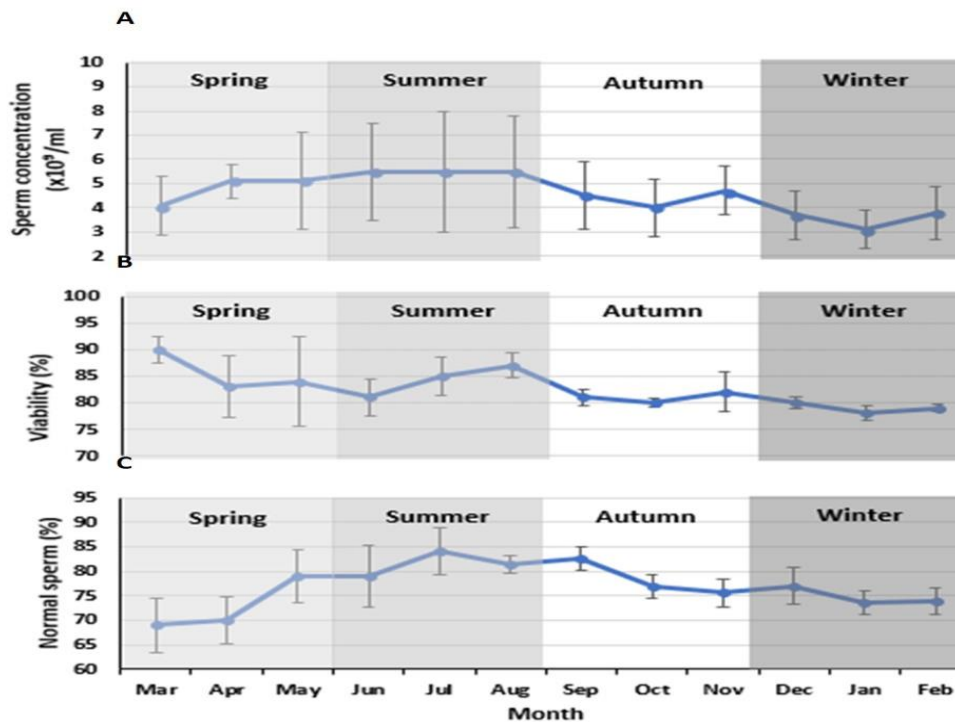
### 3.2. General seminal characteristics

In the present study, a total of 145 ejaculates were collected from seven bucks. There were 84 ejaculates collected from the first ejaculation that were analyzed for general seminal characteristics and CASA sperm motility variables (Tables 4 and 5; Figs 2, 3 and 4). Semen volume and concentration were affected by body weight. Except for semen volume, semen characteristics were affected by month or season. An increase in sperm concentration occurred during the summer ( $5.5 \pm 2.2 \cdot 10^9/\text{ml}$ ) compared with the winter ( $3.5 \pm 1.0 \cdot 10^9/\text{ml}$ ;  $P < 0.05$ ). Sperm viability was greater in the spring and summer ( $86 \pm 6.8\%$  and  $84 \pm 3.9\%$ , respectively) than during autumn and winter ( $81 \pm 2.3\%$  and  $79 \pm 1.3\%$ , respectively) with the greatest value being in March ( $90.9 \pm 2.5\%$ ;  $P < 0.001$ ). The greatest percentage of normal sperm was in the summer ( $82 \pm 4.9\%$ ) while the least was in the winter and spring ( $75 \pm 3.2\%$  and  $73 \pm 6.7\%$ , respectively;  $P < 0.001$ ).

**Table 4.** Effect of season on general seminal characteristics in Beni Arouss bucks ( $n = 7$ )

Variables	Season			
	Spring	Summer	Autumn	Winter
Semen volume (ml)	$0.8 \pm 0.3$	$0.7 \pm 0.4$	$0.8 \pm 0.3$	$0.6 \pm 0.3$
Sperm concentration ( $\times 10^9/\text{ml}$ )	$4.8 \pm 1.4^{ab}$	$5.5 \pm 2.2^a$	$4.4 \pm 1.2^{bc}$	$3.5 \pm 1^c$
Viability (%)	$86 \pm 6.8^A$	$84 \pm 3.9^A$	$81 \pm 2.3^B$	$79 \pm 1.3^B$
Normal sperm (%)	$73 \pm 6.7^C$	$82 \pm 4.9^A$	$78 \pm 3.9^B$	$75 \pm 3.2^C$

Data are shown as mean  $\pm$  SD. Means with different superscript letters in the same row are different; lowercase letters:  $P < 0.05$ ; uppercase letters:  $P < 0.001$



**Fig. 2.** Monthly variations in sperm concentration (A), viability (B) and normal sperm (C) in Beni Arouss bucks; Data are shown as mean  $\pm$  SD ( $P < 0.05$ )

### 3.3. Sperm motility and head morphometry variables

Whereas there was no body weight effect on values for sperm variables, seasonal variation affected semen kinematic motility except for the percentage of rapidly progressive motile spermatozoa (rapid spermatozoa; Table 5, Fig. 3). There was the greatest percentage of motile spermatozoa (total motility, TM) in the autumn ( $P < 0.05$ ) in comparison with mean percentages in the spring and summer. The least percentage of sperm moving progressively forward (progressive motility, PM) was recorded in the winter ( $P < 0.05$ ) in comparison with mean percentage values in the spring, summer and autumn. There was a greater value for sperm velocities, curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL) and average path velocity (VAP) during the autumn, followed by lesser values ( $P < 0.05$  and  $P < 0.001$ , respectively for VCL and VAP and VSL) during the winter and spring.

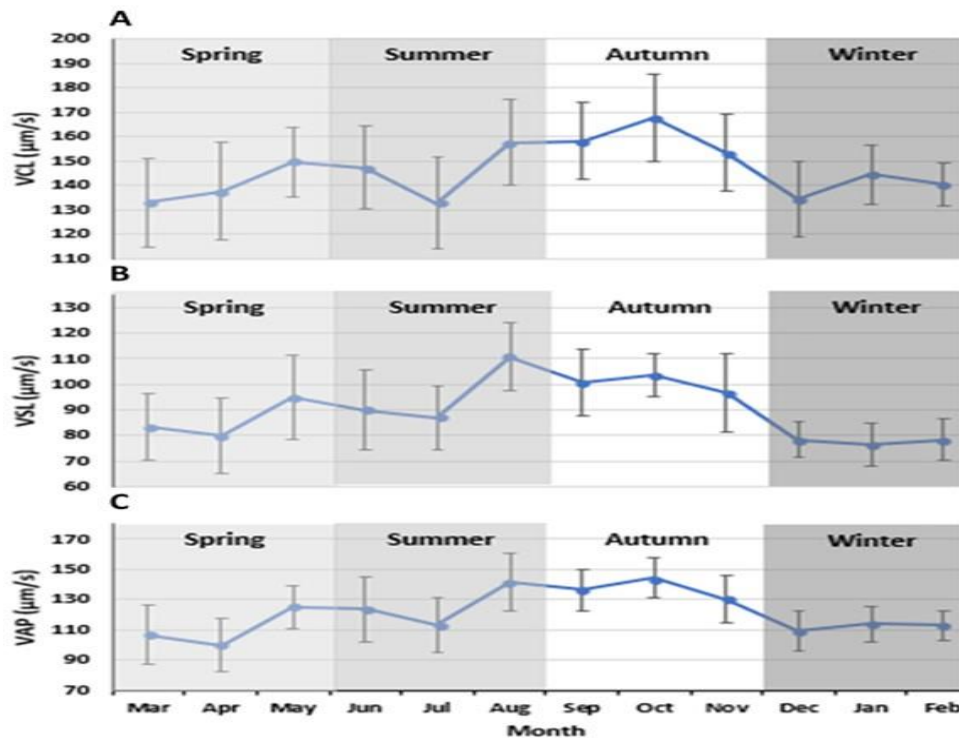
Values for sperm head morphometric CASA measurements are also depicted in Table 5 and Figure 4. Season influenced head morphometric dimensions ( $P < 0.001$ ). There was an increase in head length, width, area and perimeter during the autumn.

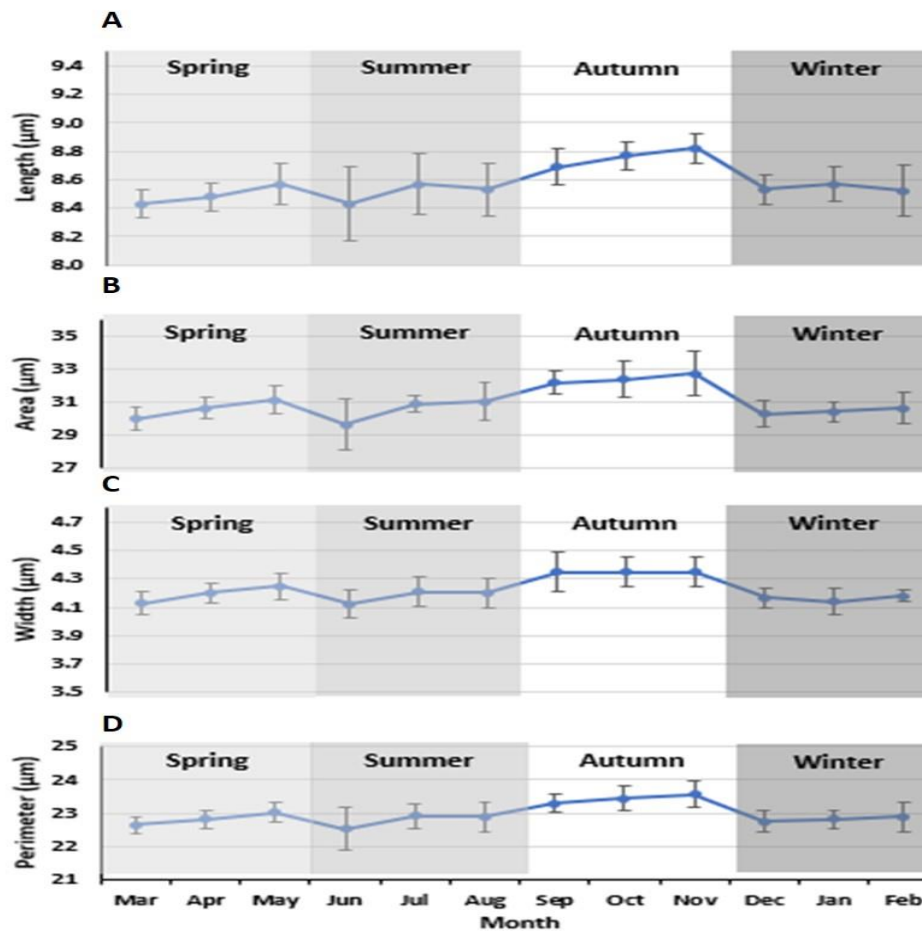
**Table 5.** Effect of season on values for sperm motility and morphometry variables in Beni Arouss bucks ( $n = 7$ )

Variables	Season			
	Spring	Summer	Autumn	Winter
TM (%)	$88.4 \pm 5.7^b$	$89.5 \pm 4^b$	$92.2 \pm 3.3^a$	$90.8 \pm 5.9^{ab}$
PM (%)	$75.1 \pm 5.6^a$	$77 \pm 3.5^a$	$77.1 \pm 2.6^a$	$72.3 \pm 5.3^b$
Rapid spermatozoa (%)	$85.1 \pm 7.5$	$86.2 \pm 5$	$89.5 \pm 3.9$	$86.1 \pm 8.8$
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	$140.1 \pm 18.2^b$	$145.9 \pm 20^b$	$159.7 \pm 16.8^a$	$139.6 \pm 12.6^b$
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	$86.1 \pm 15.6^B$	$95.9 \pm 17.2^A$	$100.4 \pm 12.3^A$	$77.7 \pm 7.4^C$
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	$110.5 \pm 19.7^c$	$126.1 \pm 22.2^b$	$137 \pm 14.9^a$	$112 \pm 11.4^c$
Length ( $\mu\text{m}$ )	$8.5 \pm 0.1^B$	$8.5 \pm 0.2^B$	$8.8 \pm 0.1^A$	$8.5 \pm 0.1^B$
Width ( $\mu\text{m}$ )	$4.2 \pm 0.1^B$	$4.2 \pm 0.1^B$	$4.3 \pm 0.1^A$	$4.2 \pm 0.1^B$
Area ( $\mu\text{m}^2$ )	$30.6 \pm 0.9^B$	$30.5 \pm 1.3^B$	$32.4 \pm 1.1^A$	$30.4 \pm 0.8^B$
Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	$22.8 \pm 0.3^B$	$22.8 \pm 0.5^B$	$23.4 \pm 0.3^A$	$22.8 \pm 0.3^B$

TM, total motility; PM, progressive motility; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight line velocity; VAP, average path velocity.

Data are shown as mean  $\pm$  SD. Means with different superscript letters in the same row are different; lowercase letters:  $P < 0.05$ ; uppercase letters:  $P < 0.001$ .

**Fig. 3.** Monthly variations in values for sperm motility variables: (A) curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), (B) straight line velocity (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ) and (C) average path velocity (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ) in Beni Arouss bucks; Data are shown as mean  $\pm$  SD ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Monthly variations in values for sperm morphometry variables: (A) length (μm), (B) area (μm), (C) width (μm) and (D) perimeter (μm) in Beni Arouss bucks; Data are shown as mean  $\pm$  SD ( $P < 0.05$ ).

#### 3.4. Correlation between testicular measurements, general seminal characteristics and sperm motility and head morphometry variables

Correlation coefficients of physical measurements with conventional seminal characteristics and CASA of motility and morphometry are shown in Table 6. The values for a majority of conventional seminal characteristics were positively correlated ( $P < 0.05$ ) with values for physical measurements but the relationship was rather minimal ( $r < 0.5$ ). Most of the values for variables assessed with CASA were not correlated with values for testicular measurements. Similarly, the values for conventional and CASA variables were not correlated. Some of these values were moderately correlated ( $P < 0.05$ ;  $r < 0.5$ ). Among physical measurement variables, values for the SC and TD had the largest coefficients of correlation and with TL ( $r = 0.7 - 0.8$ ;  $P < 0.05$ ). As expected, there was a positive correlation between values for semen volume and sperm concentration ( $r = 0.3$ ;  $P < 0.05$ ). Testicular size was also positively correlated with values for semen volume ( $r > 0.3$ ;  $P < 0.05$ ) and sperm concentration ( $r > 0.2$ ;  $P < 0.05$ ). For CASA variables, values for TM, PM and rapid spermatozoa were correlated ( $P < 0.05$ ;  $r = 0.7 - 0.9$ ). Likewise, values for velocities (VCL, VSL and VAP) were positively correlated ( $r = 0.7 - 0.9$ ;  $P < 0.05$ ). Values for morphometric variables were

correlated ( $r = 0.6 - 0.9$ ;  $P < 0.05$ ) except for length and width ( $r < 0.5$ ). Correlation between the values for conventional and CASA motility indicated there was a positive correlation between values for sperm viability and PM ( $r = 0.4$ ;  $P < 0.05$ ) and between values for the percentage of normal sperm and VSL and VAP ( $r = 0.4$ ;  $P < 0.05$ ).

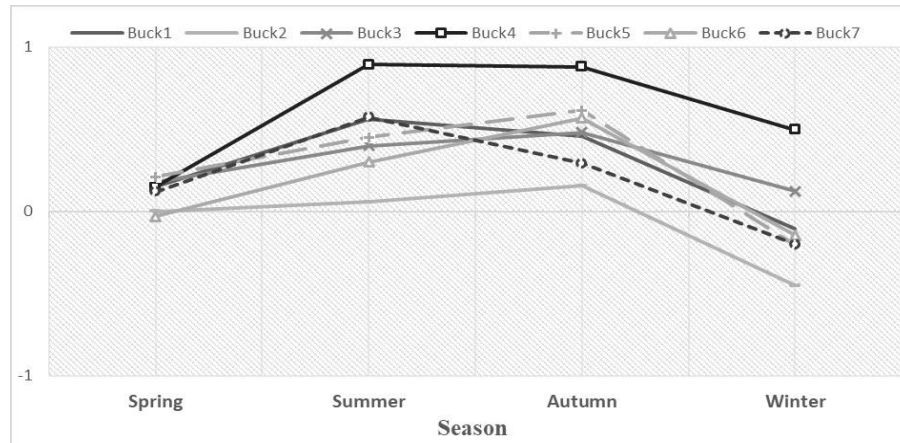
**Table 6.** Correlation coefficients between values for buck reproductive variables; First ejaculate of each monthly collection was considered for seven bucks

	SC	TD	TL	Semen volume	Sperm concentration	Viability	Normal sperm	TM	PM	Rapid spermatozoa	VCL	VSL	VAP	Length	Width	Area	Perimeter
SC	-	0.84	0.73	0.37	0.30	NS	0.32	NS	0.26	NS	NS	NS	0.22	NS	0.28	NS	NS
TD		-	0.67	0.36	0.25	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TL			-	0.35	0.21	NS	0.22	NS	0.31	NS	NS	0.26	NS	NS	0.29	NS	NS
Semen volume				-	0.35	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Sperm concentration					-	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0.34	NS	-0.23	-0.31
Viability						-	NS	NS	0.40	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Normal sperm							-	NS	0.28	NS	0.28	0.42	0.42	0.24	0.24	0.25	0.23
TM								-	0.67	0.96	0.36	NS	0.23	NS	NS	NS	NS
PM									-	0.75	0.27	0.44	0.32	NS	NS	NS	NS
Rapid spermatozoa										-	0.44	NS	0.31	NS	NS	NS	NS
VCL											-	0.75	0.91	0.42	NS	0.33	0.41
VSL												-	0.91	0.23	0.30	0.29	0.27
VAP													-	0.38	0.27	0.36	0.39
Length														-	0.47	0.82	0.94
Width															-	0.86	0.63
Area																-	0.93
Perimeter																	-

SC, scrotal circumference; TD, testicular diameter; TL, testicular length; TM, total motility; PM, progressive motility; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight line velocity; VAP, average path velocity; Correlation coefficients are indicated if  $P < 0.05$ ; NS: non-significant correlation.

### 3.5. Global reproduction performance score

Variations of the global reproductive performance score with season and for each buck are shown in Figure 5. In all bucks, the maximum reproductive performance score was observed in the summer and/or autumn.



**Fig. 5.** Seasonal variations of the global reproduction performance score in Beni Arouss bucks.

## 4. Discussion

This study is the first in which there was evaluation of seasonal changes in reproductive physiology in Beni Arouss males by measuring testes size, reproductive behavior and seminal characteristics using conventional methods and CASA. Because the Beni Arouss goat population which is indigenous to the North of Morocco has been recently considered to be classified as a local breed (official Journal of Kingdom of Morocco; No. 6430; 01/2016), actions are being taken to ensure selection of this status. In the present study, reproductive characteristics of seven sexually mature bucks were investigated. Animals were not selected for study inclusion based on weight and age but rather based on being sexually mature which resulted in some of the individual differences in results among animals. Body weight was taken into consideration in the statistical model and affected values for testicle size as well as semen volume and concentration results, whilst the values for other variables were not affected by body weight. Ahmad and Noakes (1996) and Delgadillo et al. (1991) reported body weight and age among factors affecting semen characteristics, but seasonality had greater effect on these characteristics in the present study. In Mediterranean regions, reproductive characteristics of bucks are also affected by feed quality and availability (Perez and Mateas, 1996; Zarazaga et al., 2009). Throughout the present study, the same feeding program was used, thereby minimizing nutrition-related changes on reproduction performance.

The results of the present study indicate reproductive activity of Beni Arouss bucks was maintained throughout the year in natural photoperiod conditions (35°N 5°O), however, bucks have seasonal variations in reproductive activity. In the Mediterranean area, from previous studies it has been reported that seasonal variations in reproductive characteristics of bucks occurred as a result of photoperiod and especially at some latitudes (Perez and Mateas, 1996; Zarazaga et al., 2009; Arrebola et al., 2010; Gallego-Calvo et al., 2015; Arrebola and Abecia, 2017). Bucks in latitudes between 30° and 40°N in the Mediterranean areas (e.g., Murciano-Granadina, Verata, Payoya and Blanca Andaluza breeds) had a moderate seasonal increase in values for many reproductive variables during the summer and autumn (Roca et al., 1992; Perez and Mateas, 1996; Zarazaga et al., 2009; Arrebola et al., 2010; Gallego-Calvo et al., 2015;

Arrebola and Abecia, 2017). Male goats of several breeds that were located in the higher latitudes (e.g. Alpine and Saanen breeds raised in latitudes above 40°N), had marked seasonal variations in semen production and sexual activity that were maximal during days when there was a decreasing photoperiod (Delgadillo and Chemineau, 1992; Chemineau et al., 1999). In latitudinal zones of less than 30°N, the seasonality of reproduction is quasi absent in these breeds (Chemineau, 1986).

Similar to animals of other breeds that are located in lower latitudes (30-40°N) in the Mediterranean and the Middle East regions such as the Blanca Andaluza (Gallego-Calvo et al., 2015), Payoya (Zarazaga et al., 2009), Murciano-Granadina (Arrebola et al., 2010), Verata (Perez and Mateas, 1996), Zaraibi (Barkawi et al., 2006) and Markhoz (Talebi et al., 2009) the greatest values for most of the variables for animals of the Beni Arouss breed were observed during summer and autumn and the least values were in winter. Apparently North Moroccan bucks respond to seasonal changes in similar ways as Murciano-Granadina bucks in Spain (Arrebola et al., 2010) and Zaraibi bucks in Iran (Barkawi et al., 2006) by not being affected by the relatively greater temperatures during the summer.

In the current study, values for testicular measurements were recorded monthly and all the data indicate values were at a maximum in September. When the data were grouped by season there were the greatest values for SC, TD and TL in the summer and autumn with the least values being in the winter. These findings are comparable to those of bucks of the Murciano-Granadina (Roca et al., 1992), Atlas Moroccan (Douk, 1996), Verata (Perez and Mateas, 1996), Saanen and Nubian (Babiker Abdelhai, 2003), Damascus (Al-Ghalban et al., 2004), Rayini (Zamiri and Heidari, 2006) and North Moroccan (Chentouf et al., 2011) breeds or populations. There were fewer mounts before the first ejaculation during the summer and early autumn (September) suggesting that libido was greatest during this season of the year. This trend is comparable to that reported by Barkawi et al. (2006) during the summer where there were fewer mounts and a lesser reaction time per first and second ejaculation.

There were greater sperm concentrations in the spring and summer than winter with a maximum between June and August. Findings in the present study are consistent with those of Arrebola et al. (2010), Chentouf et al. (2011), Wang et al. (2015) and Arrebola and Abecia (2017). In Creole bucks in Mexico, there was the greatest sperm concentration from May to September and the least in February and March (Delgadillo et al., 1999), which is consistent with results of the present study. Also in the present study, there were no seasonal effects on semen volume. Similarly, volume did not differ between seasons in bucks of the Malaguena (Perez and Mateas, 1996), Korean Native (Choe et al., 2006), Murciano-Granadina (Arrebola et al., 2010; Arrebola and Abecia, 2017) and Payoya (Arrebola and Abecia, 2017) breeds. Semen viability ranged from 89% to 76% and was relatively consistent throughout the year. The values, however, were greatest in the spring and summer and maximum in August. These results are consistent with those of Al-Ghalban et al. (2004). In British bucks, however, the values were greatest for live sperm during autumn and winter and least during the spring and summer (Ahmad and Noakes, 1996). In Korean Native and North Moroccan indigenous bucks, there were no seasonal variations for sperm viability (Choe et al., 2006; Chentouf et al., 2011). The percentage of normal sperm was greater during the summer (maximum between July and September, being about 83%), while dead sperm values were greater during the winter and spring (26%). This finding is consistent with that of Perez and Mateas (1996) in Verata bucks and similar to those reported for bucks of different breeds (Karagiannidis et al., 2000; Barkawi



et al., 2006; Talebi et al., 2009). In these reports, there were the least values for normal sperm in the winter and spring, while there was the greatest proportion of normal spermatozoa in the autumn. There was less normal sperm morphology in the winter in Murciano-Granadina bucks (Roca et al., 1992). In Damascus and Rayini bucks, however, there were greater values for normal sperm in the spring and summer, while the least values were in the autumn (Al-Ghalban et al., 2004; Zamiri and Heidari, 2006).

Sperm quality was also assessed using the CASA system for the sperm motility and head morphometry characteristic variables. Sperm motility and especially progressive sperm motility and sperm velocities are essential for sperm migration efficiency, oocyte penetration, capacitation and, therefore, for potentially predicting fertilizing capacity (Cox et al., 2006). In the current research, results indicate that values for most of motility variables (PM, VSL and VAP) were greater in the summer and autumn than those in the winter. In semen from Xinong-Saanen bucks, Wang et al. (2015) also reported that values for some of the CASA motility variables were greater in the autumn than those observed in other seasons. Zarazaga et al. (2009) and Gallego-Calvo et al. (2015), working with Payoya and Blanca Andaluza bucks, reported that there were lesser values for sperm motility variables during the winter compared with the summer, with no differences being detected among the other seasons.

Sperm head morphometry has also been analyzed in relation to fertility in many species. The variation in sperm head dimensions can be considered as an indicator of fertility potential in goats (Hidalgo and Dorado, 2009). In stallions, the sperm morphometry analysis of head area and perimeter were less in stallions with greater fertility (Waheed et al., 2015). Accordingly, dimensions of the sperm head appear to be useful for differentiation between males of relatively greater as compared with those with relatively lesser fertility. Similarly, there was a negative correlation between spermatozoa with a short and wide head and fertility when there was use of fresh ram semen (Martinez-Rodriguez et al., 2015). Inconsistent with this finding, Bravo et al. (2014) reported there was a greater spermatozoa head length and size in rams during the breeding season. For goats, to our knowledge, there have been no previous studies of the effect of season on buck sperm head morphometry. Although the physiological significance of these variables seems unclear and not correlated with values related to semen viability, there was an increase of length, width, surface and perimeter of spermatozoa heads in the autumn.

Regarding correlation analyses, there were correlations between values for physical measurements and conventional seminal characteristics but these did not appear to be a predictor of semen quality. Correlation analysis between values for conventional semen characteristics and CASA variables indicated that viability of sperm was of a similar pattern of change as that for increased progressive motility. Also, normal spermatozoa swim faster and values for this variable are correlated with normal morphology, VSL and VAP. This finding is consistent with that of several studies with human sperm (Katz et al., 1982; Morales et al., 1988; Sivanarayana et al., 2012).

To assess seasonality of reproduction performance of individual animals while considering values for all reproductive variables, a global reproduction score was calculated in the present study. This score takes into account the time-related modifications of values for each variable which in turn is weighted based on relative importance of the variable to fertility capacity (see Table 1 for details). Accordingly, this score reflects the magnitude of seasonal changes for each

buck rather than an absolute evaluation of reproduction capacity. There is general agreement of the primary effects of sperm motility, concentration, viability and spermatozoa morphology (Gomendio et al., 2007; Gillan et al., 2008; Love, 2011), thus, the relative weight of these semen characteristics and sperm motility was greatest, followed by sperm morphometry, sexual behavior and testicular measurements in calculation of the global reproduction score. In developing this scoring system, the previous detailed results where there was assessment of reproductive activity of North Moroccan bucks was particularly considered with these results indicating there was greater reproductive function when photoperiod starts decreasing (at summer solstice) and this trend for changes in reproductive function continues into the autumn period. This scoring system further indicates that individual bucks do not undergo seasonal changes of similar magnitude and that some animals have a greater increase in the score in the summer or autumn whereas others have a pronounced decrease in the winter. These individual variations are not assessed by considering mean results but are known to be important in individual animals (Bravo et al., 2011; Vicente-Fiel et al., 2013).

## **5. Conclusion**

Results of the present study indicate that reproduction of North Moroccan bucks have a distinct seasonal pattern for reproductive capacity. There were the greatest values for semen variables during the summer and autumn which suggests that ejaculates collected during the summer and autumn would be more suitable for cryopreservation than those collected during the other seasons of the year. Even though there was a significant seasonal effect, there were values for reproductive characteristic and sperm quality variables that were sustained throughout the year that were greater than the minimal limits for use of semen in AI in goat and sheep centers. The reproductive performance score indicated that seasonal changes of reproduction capacity differ between individuals.

## **Conflict of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality in conducting the experiment and publishing the manuscript.

## **Acknowledgments**

This research was supported by the Belgian Academy for Research and Higher Education-Development Cooperation Committee (ARES-CCD). It was conducted at INRA, Regional Center of Tangier. We thank staff of this center for his support and collaboration. The statistical assistance of Dr. Ahmed Douaik is gratefully acknowledged.

## **References**

- Ahmad, N., Noakes, D.E., 1996. Seasonal variations in the semen quality of young british goats. *Br. Vet. J.* 152, 225-236.
- Al-Ghalban, A.M., Tabbaa, M.J., Kridli, R.T., 2004. Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks. *Small Rumin. Res.* 53, 141-149.
- Arrebola, F.M., Pérez-Marín, C.C., Santiago-Moreno, J., 2010. Limitation of seasonality in reproductive parameters of Mediterranean bucks, using photoperiod treatment. *Small Rumin. Res.* 89, 31-35.
- Arrebola, F.M., Abecia, J.-A., 2017. Effects of season and artificial photoperiod on semen and seminal plasma characteristics in bucks of two goat breeds maintained in a semen collection center. *Vet. World* 10, 521-525.

- Babiker Abdelhai, E.A., 2003. Effect of Season on Sexual Behaviour, Semen Quality and Fertility of Nubian, Saanen and Crossbred Bucks in Sudan. Ph.D. Thesis. Department of Reproduction and Obstetrics University of Khartoum.
- Barkawi, A.H., Elsayed, E.H., Ashour, G., Shehata, E., 2006. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Rumin. Res.* 66, 209-213.
- Benjelloun, B., Alberto, F. J., Streeter, I., Boyer, F., Coissac, E., Stucki, S., BenBati, M., Ibnelbachyr, M., Chentouf, M., Bechchari, A., Leempoel, K., Alberti, A., Engelen, S., Chikhi, A., Clarke, L., Flicek, P., Joost, S., Taberlet, P., Pompanon, F., NextGen Consortium, 2015. Characterizing neutral genomic diversity and selection signatures in indigenous populations of Moroccan goats (*Capra hircus*) using WGS data. *Front. Genet.* 6, 107.
- Bishop, M.W.H., Campbell, R.C., Hancock, J.L., Walton, A., 2009. Semen characteristics and fertility in the bull. *J. Agric. Sci.* 44, 227-248.
- Bouaissa, M., 2017. Valorisation des ressources génétiques caprines au niveau national. 14ème Foire Régionale Caprine de Chefchaouen: Tous pour un développement durable de la filière caprine, Chefchaouen, Maroc.
- Bravo, J.A., Montanero, J., Calero, R., Roy, T.J., 2011. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. *Anim. Reprod. Sci.* 129, 22-29.
- Bravo, J.A., Montanero, J., Calero, R., Roy, T.J., 2014. Influence of season and reproductive management on the morphometry of ram sperm head. *Small Rumin. Res.* 119, 114-119.
- Chemineau, P., 1986. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. *Reprod. Nutr. Dev.* 26, 453-460.
- Chemineau, P., Baril, G., Leboeuf, B., Maurel, M.C., Roy, F., Pellicer-Rubio, M., Malpaux, B., Cognie, Y., 1999. Implications des progrès récents en physiologie de la reproduction pour la conduite de la reproduction dans l'espèce caprine. *INRA Prod. Anim.* 12, 135-146.
- Chentouf, M., Bister, J.L., Boulanouar, B., 2011. Reproduction characteristics of North Moroccan indigenous goats. *Small Rumin. Res.* 98, 185-188.
- Choe, C.-Y., Kim, J.-G., Cho, S.-R., Son, D.-S., Kim, Y.-K., Balasubramanian, S., Choe, S.-Y., Rho, G.-J., 2006. Influence of Seasons, Extenders, Slow and Rapid Freezing on Seminal Characters in korean Native Bucks. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 55-60.
- Cox, J.F., Alfaro, V., Montenegro, V., Rodriguez-Martinez, H., 2006. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology* 66, 860-867.
- Del Olmo, E., Bisbal, A., Maroto-Morales, A., Garcia-Alvarez, O., Ramon, M., Jimenez-Rabadan, P., Martinez-Pastor, F., Soler, A.J., Garde, J.J., Fernandez-Santos, M.R., 2013. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Anim. Reprod. Sci.* 138, 102-109.
- Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1991. Decrease in the seasonality of sexual behaviour and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 36, 755-770.
- Delgadillo, J.A., Chemineau, P., 1992. Abolition of the seasonal release of luteinising hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. *J. Reprod. Fert.* 94, 45-55.
- Delgadillo, J.A., Canedo, G.A., Chemineau, P., Guillaume, D., Malpaux, B., 1999. Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male creole goats in subtropical northern Mexico. *Theriogenology* 52, 727-737.
- Douk, A., 1996. Variations saisonnières de la taille testiculaire et des caractéristiques du sperme chez le caprin noir de montagne. Thèse de doctorat vétérinaire. I.A.V. Hassan II, Rabat, Maroc.
- El Otmani, S., Hilal, B., Chentouf, M., 2014. Milk production and composition of 'Beni Arousse' North Moroccan local goat. 39th ICAR Session, Berlin, Germany.

- Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney. pp. 107-141.
- Gadea, J., 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* 63, 431-444.
- Gallego-Calvo, L., Gatica, M.C., Santiago-Moreno, J., Guzmán, J.L., Zarazaga, L.A., 2015. Seasonal changes in reproductive activity, sperm variables and sperm freezability in Blanca Andaluza bucks. *Span. J. Agric. Res.* 13, 1-10.
- Gillan, L., Kroetsch, T., Maxwell, W.M., Evans, G., 2008. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 103, 201-214.
- Gomendio, M., Malo, A.F., Garde, J., Roldan, E.R., 2007. Sperm traits and male fertility in natural populations. *Reproduction* 134, 19-29.
- Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., 2012. Reproductive seasonality and its control in Spanish sheep and goats. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 15, S47–S70.
- Hidalgo, M., Dorado, J., 2009. Objective assessment of goat sperm head size by computer-assisted sperm morphometry analysis (ASMA). *Small Rumin. Res.* 87, 108-110.
- Hilal, B., El Otmani, S., Chentouf, M., Boujenane, I., 2013. Morphological characterization of the local goat population 'Beni Arouss'. *Options Méditerranéennes* 108, 433-437.
- INRA, 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprins, Jarrige, E.R. (Ed), INRA, Paris, pp. 151-153.
- Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Karatzas, G., 2000. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology* 53, 1285-1293.
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., John Edwin, M., Veerapandian, C., 2008. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 9-17.
- Katz, D.F., Diel, L., Overstreet, J.W., 1982. Differences in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 26, 566-570.
- Linford, E., Glover, F.A., Bishop, C., Stewart, D.L., 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J. Reprod. Fert.* 47, 283-291.
- Love, C.C., 2011. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology* 76, 547-557.
- Martin, G.B., Blache, D., Miller, D.W., Vercoe, P.E., 2010. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. *Animal* 4, 1214–1226.
- Martínez-Rodríguez, C., Álvarez, M., López-Uruena, E., Gomes-Alves, S., Anel-López, L., Tizado, J.E., Anel, L., de Paz, P., 2015. Head morphology of ram spermatozoa is associated with their ability to migrate in vitro and correlates with fertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 28, 1825-1837.
- Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime, 2017. Situation de l'Agriculture Marocaine N°12, MAPM (Ed), 187p.
- Morales, P., Katz, D.F., Overstreet, J.W., Samuels, S.J., Chang, R.J., 1988. The relationship between the motility and morphology of spermatozoa in human semen. *J. Androl.* 9, 241-247.
- Mwaanga, S., Kataba, A., Pares-Casanova, P., Phiri, E., Lundu, T., 2014. Caudal epididymal sperm morphology and body measurements relationships of the Gwembe dwarf bucks. *Inter. J. Agr. Pol. Res.* 2, 346-351.
- Perez, B., Mateas, E., 1996. Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malaguena breeds. *Small Rumin. Res.* 22, 163-168.
- Roca, J., Martínez, E., Vázquez, J.M., Coy, P., 1992. Characteristics and seasonal variation in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Anim. Reprod. Sci.* 29, 255-262.
- Rodríguez-Martínez, H., 2003. Laboratory Semen Assessment and Prediction of Fertility: still Utopia?\*. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 312-318.
- Sivanarayana, T., Krishna Ch, R., Prakash, G.J., Krishna, K.M., Madan, K., Rani, B.S., Sudhakar, G., Raju, G.A., 2012. CASA derived human sperm abnormalities: correlation with chromatin packing and DNA fragmentation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 1327-1334.

- Talebi, J., Souri, M., Moghaddam, A., Karimi, I., Mirmahmoodi, M., 2009. Characteristics and seasonal variation in the semen of Markhoz bucks in western Iran. *Small Rumin. Res.* 85, 18-22.
- Valeanu, S., Johannisson, A., Lundeheim, N., Morrell, J.M., 2015. Seasonal variation in sperm quality parameters in Swedish red dairy bulls used for artificial insemination. *Livest. Sci.* 173, 111-118.
- Vicente-Fiel, S., Palacin, I., Santolaria, P., Yaniz, J.L., 2013. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). *Anim. Reprod. Sci.* 139, 182-189.
- Waheed, M.M., Ghoneim, I.M., Abdou, M.S.S., 2015. Morphometric Characteristics of Spermatozoa in the Arabian Horse With Regard to Season, Age, Sperm Concentration, and Fertility. *J. Equine Vet. Sci.* 35, 244-249.
- Walkden-Brown, S.W., Bocquier, F., 2000. Nutritional regulation of reproduction in goats. *Proceedings of the 7th International Conference on Goats*, Tours, France, 389-395.
- Wang, W., Luo, J., Sun, S., Xi, L., Gao, Q., Haile, A.B., Shi, H., Zhang, W., Shi, H., 2015. The effect of season on spermatozoa motility, plasma membrane and acrosome integrity in fresh and frozen-thawed semen from Xinong Saanen bucks. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 23-28.
- Yu, K., Deng, S.-L., Sun, T.-C., Li, Y., Liu, Y.-X., 2018. Melatonin Regulates the Synthesis of Steroid Hormones on Male Reproduction: A Review. *Molecules* 23, 2-7.
- Zamiri, M.J., Heidari, A.H., 2006. Reproductive characteristics of Rayini male goats of Kerman province in Iran. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 176-185.
- Zarazaga, L.A., Guzman, J.L., Dominguez, C., Perez, M.C., Prieto, R., 2009. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. *Theriogenology* 71, 1316-1325.
- Zarei, M.A., Farshad, A., Akhondzadeh, S., 2009. Variations in thyroidal activity during estrous cycle and natural breeding season in Markhoz goat breeds. *Pak. J. Biol. Sci.* 12, 1420-1424.

***Etude 2. Influence de la saison sur l'aptitude de conservation à l'état liquide de la semence du bouc Beni Arouss***

Cette étude est présentée sous forme d'article qui a été soumis au journal Animal Reproduction Science.

## **Influence of season and liquid storage at 16° C on Beni Arouss bucks semen**

**Sara El Kadili <sup>1,2</sup>, Marianne Raes<sup>1</sup>, Jean Loup Bister<sup>1</sup>, Bouchaib Archa<sup>2</sup>, Ahmed Douaik<sup>4</sup>, Mouad Chentouf<sup>3</sup>, Nathalie Kirschvink<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *University of Namur, Faculty of Sciences, Department of Veterinary Medicine, Integrated Veterinary Research Unit, Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium. Email (corresponding author): nathalie.kirschvink@unamur.be*

<sup>2</sup> *Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès, Department of Animal Production, Route Haj Kaddour, BP. S/40, 50001 Meknes, Morocco. Email (corresponding author): s.elkadili@gmail.com*

<sup>3</sup> *Institut National de la Recherche Agronomique, Regional Center of Tangier, Bd Sidi Mohamed Ben abdellah78, 90010 Tangier, Morocco.*

<sup>4</sup> *Institut National de la Recherche Agronomique, Regional Center of Rabat, PB 6570, 10101 Rabat, Morocco.*

## **Présentation de l'étude**

Suite à la première étude caractérisant le comportement sexuel et la qualité de la semence du bouc Beni Arouss au cours de l'année, la qualité de conservation de la semence a été évaluée. Cette étude s'inscrit dans la volonté de développer un centre d'insémination avec une possibilité de conservation simple, soit à 16°C.

Afin d'évaluer l'effet de la saison sur la qualité de conservation à l'état liquide de la semence chez les boucs Beni Arouss, les éjaculats récoltés mensuellement à l'aide d'un vagin artificiel de sept boucs matures ont été dilués dans un dilueur synthétique à une concentration finale de  $800 \times 10^6$  spermatozoïdes. ml<sup>-1</sup>, et conservés à 16 °C pendant 24 h. La motilité, la viabilité et la morphologie du sperme ont été évaluées à 0, 4, 8 et 24 h après conservation. Les paramètres de motilité et de morphologie ont été analysés en utilisant le système CASA et la viabilité a été déterminée après une coloration à l'éosine et la nigrosine.

Comme prévu, les paramètres de motilité, de viabilité et de morphologie ont montré une réduction significative au cours des 24 heures de conservation et cela dans toutes les saisons. Cependant, après 24 heures de conservation, le sperme collecté en été (début de la saison de reproduction) était de meilleure qualité (19 – 29% de baisse de qualité) que celui récolté en automne, toujours pendant la saison de reproduction chez cette race (28 – 46% de baisse de qualité) ou dans les autres saisons de faible reproduction.

En guise de conclusion, la saison influence les caractéristiques du sperme chez le bouc Beni Arouss avec une meilleure aptitude à la conservation à 16 °C obtenue en été.

## **ABSTRACT**

The study aimed at determining the effect of storage and season on fresh semen of Beni Arouss goats. Ejaculates were collected at monthly intervals from seven mature bucks and were extended at a final concentration of  $800 \times 10^6$  spermatozoa. ml<sup>-1</sup> and stored at 16°C during 24 h. Semen motility, viability and normal morphology were assessed at 0, 4, 8 and 24 h after collection. Motility and normal morphology parameters were recorded using a computer assisted sperm analysis (CASA) and viability was analyzed using eosin-nigrosin staining. As expected, motility, viability and normal morphology parameters showed a significant reduction within 24 h of storage and during all seasons. However, semen collected in summer maintained a better quality after 24 hours of storage at 16°C than semen collected during the other periods. In conclusion, storage ability of Beni Arouss bucks' semen stored at 16°C was significantly higher during summer.

**Keywords:** Beni Arouss buck; Season; Liquid storage; Motility; Viability; Normal morphology



## 1. Introduction

In the North of Morocco, goat production plays an important social and economic role and represents a live-hood base for 70% of the rural population (Chentouf et al., 2011). However, low productivity limits the producers' income (Chentouf et al., 2006). This has led farmers to replace local goats by higher yielding foreign breeds or to perform crossings between local and foreign breeds. This large-scale dissemination of imported dairy goat breeds led to erosion of indigenous goat genetic resources. In 2007, the food and agriculture organization (FAO) launched the global plan of action for animal genetic resources to strive against the loss of animal genetic diversity and to preserve the zoogenetic resources.

Beni Arouss is an autochthonous North Moroccan goat breed, recently recognized by Moroccan Ministry of Agriculture (official Journal of Kingdom of Morocco; No. 6430; 01/2016) whose name is derived from the geographical location. This breed is characterized by a good milk production performance and an excellent adaptation to local conditions and resistance to pests and diseases (El Otmani et al., 2014). A breeding program aiming at preservation and improvement of the production potential of Beni Arouss goats is ongoing. The implementation of an artificial insemination (AI) center to support this program is planned by the government. The use of AI should largely contribute to an optimised preservation and dissemination of valuable traits and should lead to an improved productivity of North Moroccan goats.

In recent years, AI with fresh semen has become a common technique in goats (Leboeuf et al., 2000; Leboeuf et al., 2003; Paulenz et al., 2005). However, the stability of good quality semen during liquid storage remains crucial in order to provide a greater flexibility between the AI center and farms where insemination of does needs to be performed.

An earlier study of our group showed that the quality of Beni Arouss buck semen is influenced by the season of the year (El Kadili et al., 2019). The influence of liquid storage (Benmoula et al., 2017) and cryopreservation (D'Alessandro and Martemucci, 2003; Wang et al., 2015; Gallego-Calvo et al., 2015) on semen quality has been shown to vary in function of seasons. To our knowledge, there are no studies investigating the influence of season on liquid storage of North Moroccan buck sperm. Therefore, the present study aims to evaluate the effect of storage at 16°C and of season on the quality of North Moroccan buck semen.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animal management and semen collection

The study was conducted from March 2015 to February 2016 at the experimental station of INRA, Regional Center of Tangier, located at the North of Morocco (35°44'N, 5°54' O). Seven sexually mature Beni Arouss bucks aged between 5 and 8 years were investigated during one year. They underwent the same management and were maintained indoors in individual pens and under natural photoperiod with uniform feeding. Diet consisted of oat hay and concentrate feed mixture distributed according to the recommended requirements of INRA (1988). Water was available *ad libitum*.

Semen was collected monthly by use of an artificial vagina over a 12-months period and stored for 24 hours at 16°C during the four seasons of the year: spring (from 21 March to 21 June), summer (from 22 June to 21 September), autumn (from 22 September to 21 December) and winter (from 22 December to 22 March). At each collection, only the first ejaculate from each buck was evaluated and stored.

## 2.2. Semen quality assessment and processing

Immediately after collection, semen was immersed into a water bath at 37°C. A predilution (v:v) using a pre-warmed lipid-free synthetic extender elaborated at laboratory level (pH = 7.2 and osmotic pressure = 320 mOsm/Kg) was performed to preserve spermatozoa. Sperm concentration was determined by manual counting with a Bürker haemocytometer. The semen sample was further extended to reach a final concentration of  $800 \times 10^6$  spermatozoa per ml. Given that semen concentration changed between animals and collections, the volume of extender needed varied to a certain extent (around 20%, which can be considered as negligible with regard to semen quality (Hayden et al, 2015)).

After evaluating semen quality at dilution (time 0), each semen sample was divided in three vials (for T4, T8 and T24) and was progressively cooled to 16°C by placing a 37°C-warm water bath containing the vials in a refrigerator. As soon as the temperature of 16°C was reached, the vials were kept at 16°C. Sperm motility, viability and normal morphology were determined after 4, 8 and 24 hours of storage. At each time point, one sample per buck was heated to 37°C by use of a heated water bath. The semen analyses were performed within 15 minutes and the analysed samples were discarded.

### 2.2.1. Sperm motility

A computer assisted sperm analysis (CASA) system (ISAS, Proiser R+D SL, Spain) was used to assess sperm motility parameters. The images were taken from 3 µl of extended semen aliquots at  $30 \times 10^6$  spermatozoa/ml, which were placed on a pre-warmed chamber slide (SpermTrack 20, Proiser R+D SL, Spain). At least 200 spermatozoa from six different fields were analyzed in each sample using a negative phase-contrast microscope at 10× magnification. Total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), rapidly progressive motile spermatozoa (rapid spermatozoa RAPID, %), velocity according to the actual path (curvilinear velocity VCL, µm/s), velocity according to the straight path (straight line velocity VSL, µm/s) and velocity according to the smoothed path (average path velocity VAP, µm/s) were determined at each time point.

### 2.2.2. Sperm viability

The viability of sperm was determined using the eosin-nigrosin (Minitube, Germany) staining according to the method described by Evans and Maxwell (1987). Smears were prepared by mixing 5 µl of eosin (2% solution), 5 µl of nigrosin (4% solution) and 5 µl of diluted semen (concentration of  $800 \times 10^6$  spermatozoa/ml) on a warm slide, allowed to react for 30 s and immediately spread with another slide. A total of 200 cells from different microscopic fields were evaluated under a bright-field microscope (60×). Spermatozoa showing partially or completely colored heads were considered as dead and only strict unstained spermatozoa were considered as alive.

### 2.2.3. Sperm morphology

Sperm morphology was evaluated using the Diff-Quik staining Kit (Microptic Automatic diagnostic system, Barcelona, Spain). Slides were prepared by smearing 3  $\mu$ l of semen sample, from the final dilution of  $800 \times 10^6$  spermatozoa/ml. Smears were air-dried for 10 min on a heating plate and fixed for 15 s in Diff-Quik fixative solution. Afterwards, they were stained with Diff-Quik solution I for 10 s and then with solution II for 10 s. Once stained, the slides were rinsed with distilled water, air dried on a heating plate and permanently sealed with Eukitt quick hardening mounting medium (Sigma-Aldrich, Quimica SA., Spain) and a coverslip. Using the morphometric module of ISAS system, stained slides were examined under UB203i microscopy, at 60 $\times$  bright-field objective. One hundred spermatozoa per sample were randomly and manually examined using this software function to determine the percentage of spermatozoa without abnormalities.

### 2.3. Statistical analysis

Data analysis was performed using PROC MIXED of SAS 9.0 software (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Mean values and standard deviations were analyzed in function of the season of the year (spring, summer, autumn and winter) and storage duration (T0, T4, T8 and T24 h). Changes in semen quality parameters after 24 hours were further calculated for each buck as percentage of T0 values (considered as 100%). An ANOVA model for repeated measures was used for each parameter of sperm quality. Prior to analysis, variables expressed as percentages were transformed to arcsine. The statistical model included the fixed effects of season and storage duration. The buck's identity was treated as a repeated effect. The first order autoregressive covariance structure was selected, based on Schwarz Bayesian criterion (Littell et al., 1998). Least squares mean for seasons was compared using PDIFF option. Data were expressed as mean  $\pm$  SD and the level of significance was set at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

The results of semen motility, viability and normal morphology at T0, T4, T8 and T24 and at each season are presented in Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, and Fig. 4. Relative changes between T0 and T24 per season are shown in Table 1. Significant effects of storage duration as well as of seasons were found for most variables and are presented below.

As analysed and discussed elsewhere in detail (El Kadili et al., 2019), the season did not significantly affect rapidly progressive motile spermatozoa in fresh and uncooled semen (T0) ( $P > 0.05$ ). The highest velocity results were recorded during summer and autumn ( $P < 0.05$ ), whereas the lowest progressive motility was recorded during winter ( $P < 0.05$ ). The rate of living spermatozoa was maximum in spring and summer and lowest in winter ( $P < 0.05$ ). The highest semen concentration and percentage of normal sperm were recorded during summer followed by autumn while the lowest counts were observed during winter and spring ( $P < 0.05$ ).

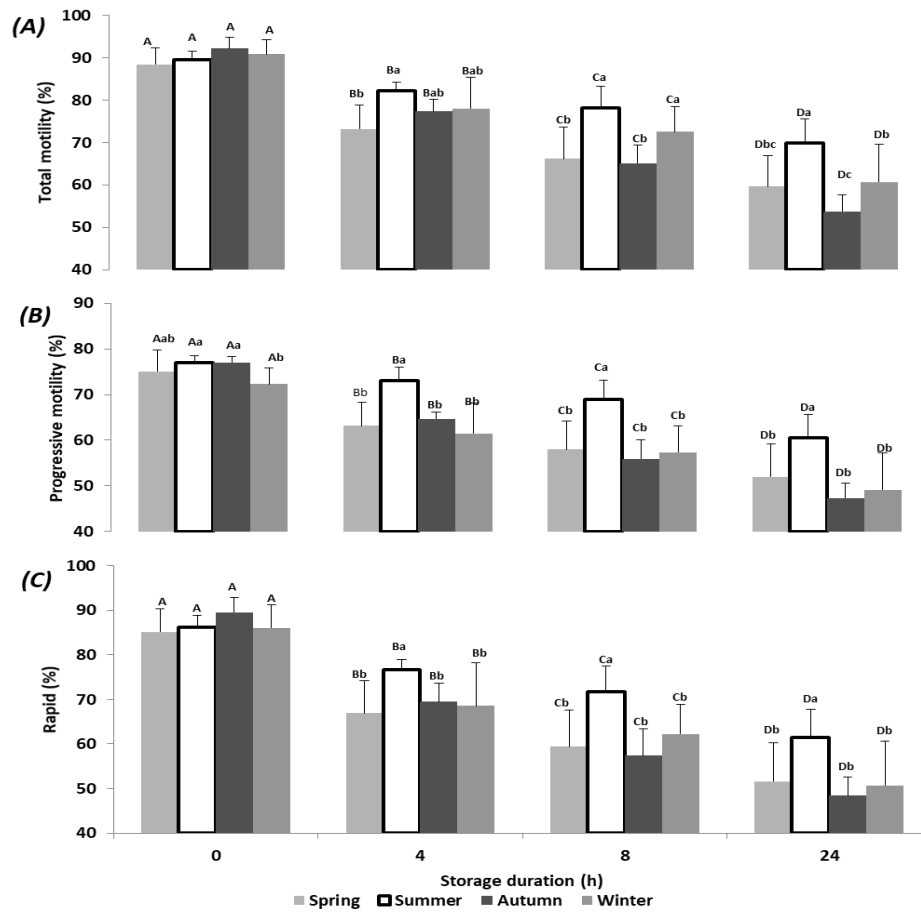
After 24h of storage, all parameters of motility, viability and morphology remained at their highest level in summer ( $P < 0.05$ ), the quality loss being lowest during this season. While the best values of motility at T0 were recorded in autumn, the most important quality loss during storage was also recorded at this time point (Table 1).

**Table 1.** Motility, viability and morphology loss (in %) of Beni Arouss buck semen after 24 hours of storage at 16°C.

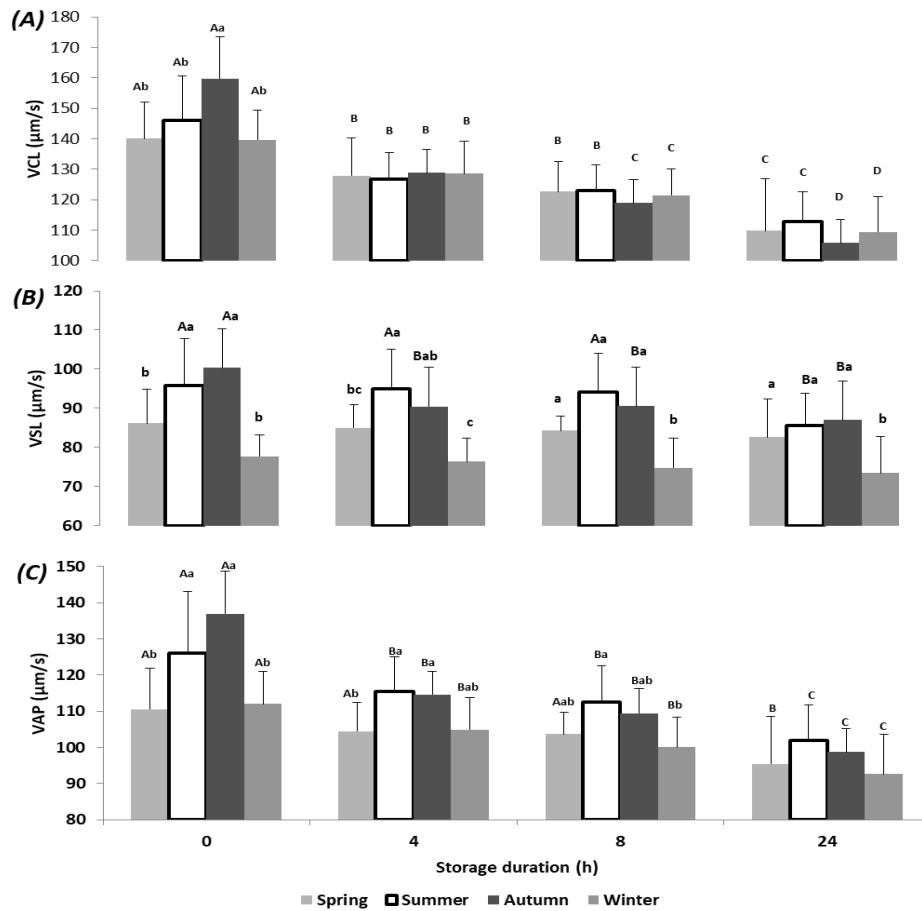
Traits	Season			
	Spring	Summer	Autumn	Winter
Total motility	32.6±7 <sup>a</sup>	21.1±5 <sup>b</sup>	41.7±4 <sup>a</sup>	33.3±8 <sup>a</sup>
Progressive motility	30.7±9 <sup>ab</sup>	21.4±5 <sup>b</sup>	38.6±4 <sup>a</sup>	32.3±9 <sup>ab</sup>
Rapid	39.4±9 <sup>ab</sup>	28.8±6 <sup>b</sup>	45.8±6 <sup>a</sup>	41.2±9 <sup>a</sup>
VCL	21.6±9 <sup>b</sup>	22.4±6 <sup>ab</sup>	33.4±7 <sup>a</sup>	21.7±5 <sup>b</sup>
VSL*	3.6±11	10.5±6	12.5±10	5.5±9
VAP	13.5±11	18.5±7	27.5±8	17.3±7
Viability	33±3 <sup>a</sup>	19.2±4 <sup>b</sup>	28.4±3 <sup>a</sup>	27.9±4 <sup>a</sup>
Normal morphology	32.8±9	28.8±2	31.8±3	37.4±5

Data are means ± SD. Means with different superscript letters in the same row are significantly different ( $P < 0.05$ ). \* Variations of VSL by season and storage time appear as inconsistent and have not been analysed statistically.

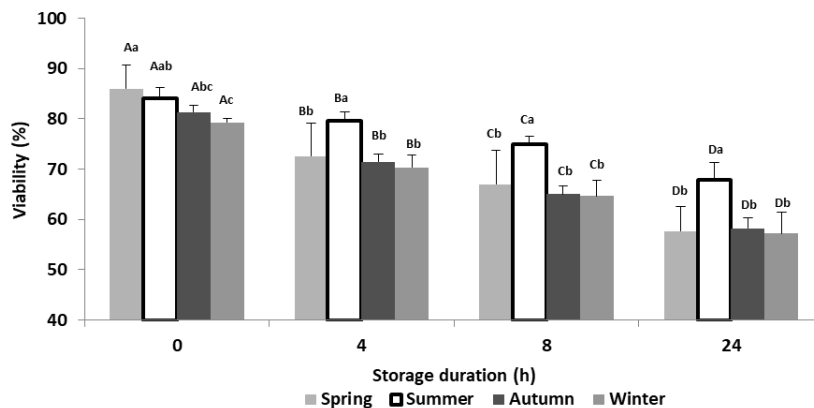
More precisely, total and progressive motility as well as the percentage of rapid spermatozoa underwent a significant reduction over time during all seasons. Interestingly, T0 values of motility tended to be highest in autumn but underwent the most important storage-related loss during this season, whereas the reduction was lowest in summer (Fig. 1 and Table 1). Regarding variables characterizing spermatozoa speed, a slight, but significant storage effect was recorded for VCL at each time point and for VAP after 24 hours. As observed for motility variables, the less important speed changes were recorded in summer despite that T0 values tended to be highest in autumn (Fig. 2). Semen viability also underwent a time-related significant decrease at each season, but as for the preceding variables, storage had its lowest impact during summer (Fig. 3, Table 2). Finally, storage-related changes of morphology occurred, as well as a significant decrease of normal spermatozoa. The impact of season was significant: lowest changes were recorded during summer, whereas the highest changes were recorded during winter (Fig. 4).



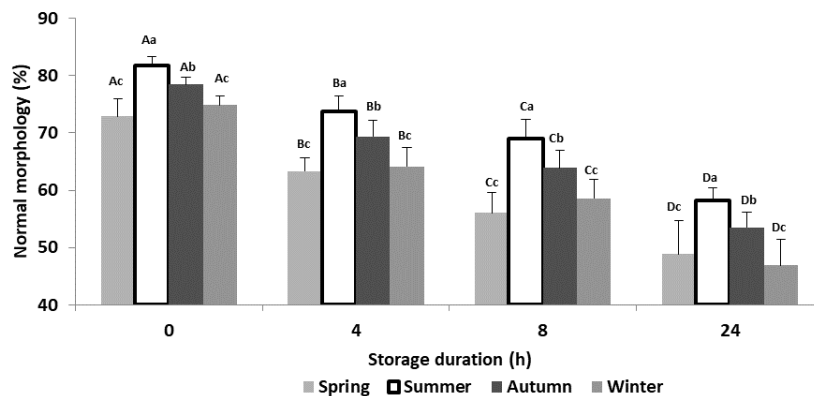
**Fig. 1.** Mean ( $\pm$ SD) of Beni Arouss bucks' sperm total motility (A), progressive motility (B) and rapidly progressive motile spermatozoa (C) after 0, 4, 8 and 24 hours of storage at 16°C and during the four seasons of the year. A, B, C, D: different capital letters indicate a significant effect of storage duration within the same season ( $P < 0.05$ ). a, b, c different lower-case letters indicate a significant effect of season at a same storage duration ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Mean ( $\pm$ SD) of Beni Arouss bucks' sperm velocities: curvilinear velocity (A), straight line velocity (B) and (C) average path velocity after 0, 4, 8 and 24 hours of storage at 16°C and during the four seasons of the year. A, B, C, D: different capital letters indicate a significant effect of storage duration within the same season ( $P < 0.05$ ). a, b, c different lower-case letters indicate a significant effect of season at a same storage duration ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 3.** Mean ( $\pm$ SD) of Beni Arouss bucks' sperm viability after 0, 4, 8 and 24 hours of storage at 16°C and during the four seasons of the year. A, B, C, D: different capital letters indicate a significant effect of storage duration within the same season ( $P < 0.05$ ). a, b, c different lower-case letters indicate a significant effect of season at a same storage duration ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Mean ( $\pm$ SD) of Beni Arouss bucks' sperm normal morphology after 0, 4, 8 and 24 hours of storage at 16°C and during the four seasons of the year. A, B, C, D: different capital letters indicate a significant effect of storage duration within the same season ( $P < 0.05$ ). a, b, c different lower-case letters indicate a significant effect of season at a same storage duration ( $P < 0.05$ ).

By considering the amplitude of time-related changes of most recorded variables, progressive and significant differences recorded between T0 and T4, T4 and T8 and T8 and T24 suggested that semen quality loss occurred progressively and increased gradually over time.

#### 4. Discussion

This study is the first to describe storage- and season-related quality change of Beni Arouss bucks' semen kept during 24 hours at 16°C in a synthetic extender. Sperm motility evaluation was performed by CASA, the system approved for reproducible and accurate assessment of sperm motility parameters (Mortimer, 2000; Verstegen et al., 2002). Several studies demonstrated that motility and velocity parameters generated by CASA can be of use to predict fertility (Farrell et al., 1998; Amann et al., 2000; Kathiravan et al., 2008; Del Olmo et al., 2013). In this context, significant positive correlations between different velocity parameters like VCL, VSL and VAP and percentage of fertilization have been reported. Indeed, sperm with decreasing motility parameters seems to undergo a gradual loss of energy needed to produce an adequate straight and progressive movement that is required for fertilization (Fernandez-Santos et al., 2011).

As described elsewhere, an influence of season on Beni Arouss bucks' libido, and semen characteristics has been evidenced (El Kadili et al., 2019). Briefly, this previous investigation shows that Beni Arouss bucks' reproduction capacity is maximal in autumn, which corresponds to the natural reproduction period of this breed (Chentouf et al., 2014). The present study focusses on the impact of storage of fresh semen in function of the season. Results of semen preservation at 16°C in a synthetic extender during 24 h indicate that the semen quality dropped progressively between 0 and 24 hours of storage. These observations are in line with previous studies showing that during conservation at 16°C, all variables evaluating motility, viability and normal morphology undergo a significant decrease, regardless of the extender in use, dilution rate, temperature and storage conditions (Upreti et al., 1997; Salamon and Maxwell,

2000; O'Hara et al., 2010). This storage-related quality loss was further subjected to seasonal changes. Although the available literature describing seasonal changes of semen quality focusses mainly on thawed semen, it appears that components of seminal plasma and/or of the extender also impact on conservation ability (Tuli and Holtz, 1995; D'Alessandro and Martemucci, 2003, 2005; Gallego-Calvo et al., 2015).

In the present study, all parameters of sperm quality except velocities remained after 24 hours of storage at a higher level in summer: quality loss due to storage at 16°C ranged from 19 to 29 %, whereas it ranged from 28 to 46 % in autumn. Considering these results, it can be hypothesized that capacity of spermatozoa to withstand liquid storage was only partially dependent on the quality of semen before storage, but that seasonal changes of seminal components might impact on quality during storage.

Seminal plasma is a mixture of cauda-epididymis and various male accessory glands secretions discharged during ejaculation (Bromfield, 2016). Described as a nutritive and protective medium for suspended sperm cells, the seminal plasma ensures significant roles for sperm metabolism, sperm function and survival, as well as for the control of sperm motility and freezing ability (Gundogan, 2006; Nasrin and Calogero, 2012). Perez-Pe et al. (2001) and Barrios et al. (2005) reported that binder of sperm proteins (BSP) with apparent molecular weight above 3 kDa and especially proteins P14 (phosphoprotein) and P20 (glycoprotein) from seminal plasma can prevent or reverse membrane damage induced by cold shock in ram semen, thereby revealing the essential role of seminal plasma in stabilisation of the sperm membrane. Considering the increase of reproductive activity in Beni Arouss bucks in summer after the seasonal anoestrus known in does (Chentouf et al., 2011), concentrations of seminal plasma proteins would be expected to increase and therefore the capacity of non-washed sperm to withstand liquid storage could be improved. It remains however unclear why this potential protective effect would not persist in autumn, during the physiological reproduction period of this breed. Given that protective (Bergeron et al., 2005; Villemure et al., 2003; Menard et al., 2003; Sanz et al., 1993) as well as deleterious effects (Manjunath et al. 2007) of BSPs have been reported in several species, their role on cooled bucks' semen remains to be established.

Moreover, during semen storage, changes in sperm metabolic performance are observed. During liquid storage, spermatozoa lose their ability to generate ATP through mitochondrial respiration due to mitochondrial ageing (Fraser et al., 2003). A decrease of mitochondrial activity and loss of ATP during liquid storage is known to have detrimental effects on sperm motility (Fraser et al., 2002). Moreover, the susceptibility of mitochondria to oxidative damage during storage seems to be increased. Spermatozoa are protected from oxidative stress by antioxidants enzymes, mainly by superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) (Marti et al., 2007; Sikka, 2002). Thus, the enzyme levels of seminal plasma are very important for sperm metabolism as well as sperm function (Brooks, 1990). Antioxidants are further involved in prevention of cold shock (Marti et al., 2007) and seasonal changes of the antioxidant capacity of seminal plasma are reported in wild boars (Koziorowska et al., 2011). The relation between metabolic activity of semen, associated antioxidant consumption and sperm quality remains however unclear. In goats, there are no studies investigating the effect of season on antioxidants enzymes and the association of these enzymes with seminal traits of fresh and cooled semen. It can only be hypothesized that the reduced resistance of autumn-collected semen to liquid storage at 16°C may be related to and



enhanced by an increased consumption of antioxidant enzymes in spermatozoa displaying a maximal metabolic activity.

Lastly, the goat semen presents characteristics that differentiates it from other species, the most important is the presence of lipases secreted by the accessory bulbourethral gland. These enzymes also called EYCE and BUSgp60 are responsible for the reduction of motility and viability of semen cooled or frozen in extenders containing egg yolk or milk (Corteel, 1981; Pellicer-Rubio and Combarnous, 1998; Leboeuf et al., 2000; Leboeuf et al., 2003). EYCE that has a phospholipase A1 activity hydrolyzes egg yolk lecithin into fatty acids and lysolecithin (Iritani and Nishikawa, 1963) and BUSgp60 hydrolyzes triglycerides in skimmed milk into fatty acids (acid oleic) (Pellicer-Rubio et al., 1997). These hydrolyses make the sperm membranes more fusogenic thereby inducing the acrosome reaction and chromatin condensation, which is toxic to sperm (Sawyer and Bown, 1995; Urepti et al., 1999). Therefore, the removal of seminal plasma by semen washing is recommended, especially during the non-breeding season when the negative impact of seminal plasma seems maximal (increase of lipase release by the bulbourethral glands) (Ritar and Salamon, 1991; Jimenez-Rabadan et al., 2012). In the current study, the activity of lipases was not expected to exert any negative effect on the quality of extended buck sperm without seminal removal because a lipid-free extender was used.

A last interesting point is the expected fertilisation capacity of Beni Arouss semen stored at 16°C. In terms of semen quality, after 24 hours of storage our results are similar to those recorded in rams by Ohara et al. (2010). The authors further assessed the gestation rate obtained after cervical IA with fresh semen and semen stored during 24 hours at 5°C in ewes and reported respectively 63% and 54%. Even it is indispensable to perform IA tests in Beni Arouss goats, the present results suggest that semen stored at 16°C during 24 hours is useable for IA.

## **5. Conclusion**

In conclusion, the present study showed that the season significantly affects the characteristics of Beni Arouss buck unwashed semen stored at 16°C. The lowest quality loss after 4, 8 and 24 hours of storage was recorded during summer, whereas the highest quality loss occurred during autumn. Although untested in the present investigation, it might be expected that semen of Beni Arouss bucks leads to satisfying fertility when used within 24 hours of storage at 16°C.

## **Conflict of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality in conducting the experiment and publishing the manuscript.

## **Acknowledgments**

This study was supported by the Belgian Academy for Research and Higher Education-Development Cooperation Committee (ARES-CCD). It was conducted at INRA, Regional Center of Tangier. The authors thank staff of this center for their assistance with animal handling and care.

## References

- Aguiar, G.V., Van Tilburg, M.F., Catunda, A.G.V., Celes, C.K.S., Lima, I.C.S., Campos, A.C.N., Moura1, A.A.A., Araújo, A.A., 2013. Sperm parameters and biochemical components of goat seminal plasma in the rainy and dry seasons in the Brazilian Northeast: the season's influence on the cooling of semen. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65, 6-12.
- Amann, R.P., Seidel, G.E., Mortimer, R.G., 2000. Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology* 54, 1499-1515.
- Barrios, B., Fernández-Juan, M., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J., 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J. Androl.* 26, 40-47.
- Benmoula, A., Badi, A., El fadili, M., El Khalil, K., Allai, L., El Hilali, A., El Amiri, B., 2017. Effect of season on scrotal circumference, semen characteristics, seminal plasma composition and spermatozoa motility during liquid storage in INRA180 rams. *Anim Reprod. Sci.* 180, 17-22.
- Bergeron, A., Villemure, M., Lazure, C. and Manjunath, P., 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 461-470.
- Bromfield, J., 2016. A role for seminal plasma in modulating pregnancy outcomes in domestic species. *Reproduction* 152, 223-232.
- Brooks, D.E., 1990. Biochemistry of the male accessory glands. In: Lammings, GE (Ed.), *Marshall's physiology of reproduction*. (4<sup>th</sup> Edn.), Edinburgh, Churchill Livingstone. pp: 569-690.
- Chentouf, M., Ben Bati, M., Zantar, S., Boulanouar, B., Bister, J.L., 2006. Evaluation des performances des élevages caprins extensifs dans le nord du Maroc. *Options Méditerranéennes* 70, 87-93.
- Chentouf, M., Bister, J.L., Boulanouar, B., 2011. Reproduction characteristics of North Moroccan indigenous goats. *Small Rumin. Res.* 98, 185-188.
- Chentouf, M., Boulanouar, B., Bister, J.L., 2014. L'élevage caprin au Nord du Maroc. INRA-Editions, Morocco, pp. 47-48.
- Corteel, J.M., 1981. Collection, processing and artificial insemination of goat semen. In: Gall, C. (Ed). *Goat Production*. Academic Press. London. pp. 171-191.
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., 2003. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Lecce ram. *Anim. Reprod. Sci.* 79, 93-102.
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., 2005. Post-thaw survival and acrosome integrity of spermatozoa of Lecce rams frozen in different seasons with a milk-egg yolk extender. *Ital. J. Anim. Sci.* 4(2), 139-148.
- Del Olmo, E., Bisbal, A., Maroto-Morales, A., Garcia-Alvarez, O., Ramon, M., Jimenez-Rabadan, P., Martinez-Pastor, F., Soler, A.J., Garde, J.J., Fernandez-Santos, M.R., 2013. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Anim. Reprod. Sci.* 138, 102-109.
- El Kadili, S., Raes, M., Bister, J.L., Archa, B., Chentouf, M., Kirschvink, N., 2019. Effect of season on sexual behavior, testicular measurements and seminal characteristics in "Beni arous" North Moroccan bucks. *Anim. Reprod. Sci.* 201, 41-54.
- El Otmani, S., Hilal, B., Chentouf, M., 2014. Milk production and composition of 'Beni Arousse' North Moroccan local goat, 39th ICAR Session, Berlin (Germany).
- Evans, G., Maxwell, W.M.C. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*, Butterworths, Sydney. pp. 107-141.
- Farrell, P.B., Presicce, G.A., Brockett, C.C., Foote, R.H., 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49, 871-879.
- Fernandez-Santos, M.R., Soler, A.J., Ramon, M., Ros-Santaella, J.L., Maroto-Morales, A., Garcia-Alvarez, O., Bisbal, A., Garde, J.J., Coloma, M.A., Santiago-Moreno, J., 2011. Effect of post-mortem time on post-thaw characteristics of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 129, 56-66.

- Fraser, L., Lecewicz, M., Strzezek, J., 2002. Fluorometric assessments of viability and mitochondrial status of boar spermatozoa following liquid storage. *Pol. J. Vet. Sci.* 5, 85-92.
- Fraser, L., Gorszczaruk, M., Lecewicz, M., Strzezek, J., 2003. Age-related changes and seasonal variations in boar sperm metabolism during liquid storage at 5° and 16°C. *J. Anim. Feed Sci.* 12, 803-811.
- Gallego-Calvo, L., Carolina Gatica, M., Santiago-Moreno, J., Guzman, J.L., Zarazaga, L.A., 2015. Seasonal changes in reproductive activity, sperm variables and sperm freezability in Blanca Andaluza bucks. *Span. J. Agric. Res.* 13, 1-10.
- Gundogan, M., 2006. Some Reproductive Parameters and Seminal Plasma Constituents in Relation to Season in Akkaraman and Awassi Rams. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30, 95-100.
- Hayden, S.S., Blanchard, T.L., Brinsko, S.P., Varner D.D., Hinrichs, K., Love, C.C., 2015. The "dilution effect" in stallion sperm. *Theriogenology* 83(4), 772-777.
- INRA, 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprins, Jarrige, E.R. (Ed.), INRA, Paris, pp. 151-153.
- Iritani, A. and Nishikawa, Y., 1963. Studies on the egg yolk coagulating factor in goat semen. III. Release of some acids accompanied by the coagulating phenomena. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 8, 109-112.
- Jimenez-Rabadan, P., Ramon, M., Garcia-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., del Olmo, E., Perez-Guzman, M.D., Bisbal, A., Fernandez-Santos, M.R., Garde, J.J., Soler, A.J., 2012. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtiberica buck ejaculates. *Anim. Reprod. Sci.* 132, 88-95.
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., John Edwin, M., Veerapandian, C., 2008. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 9-17.
- Koziorowska, M., Koziorowski, M., Strzezek, J., Fraser, L., 2011. Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. *Reprod. Biol.* 11, 37-47.
- La Falci, V.S.N., Tortorella, H., Rodrigues, J.L., Brandelli, A., 2002. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology* 57, 1035-1048.
- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 113-141.
- Leboeuf, B., Guillouet, P., Batellier, F., Bernelas, D., Bonne', J.L., Forgerit, Y., Renaud, R., Magistrini, M., 2003. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. *Theriogenology* 60, 867-877.
- Littell, R.C., Henry, P.R., Ammerman, C.B., 1998. Statistical Analysis of Repeated Measures Data Using SAS Procedures. *J. Anim. Sci.* 76, 1216-1231.
- Manjunath, P., Bergeron, A., Lefebvre, J., Fan, J., 2007. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65, 217-228.
- Marti, E., Mara, L., Marti, J.I., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J.A., 2007. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology* 67, 1446-1454.
- Ménard, M., Nauc, V., Lazure, C., Vaillancourt, D., Manjunath, P., 2003. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of proteins in stallion seminal fluid. *Mol. Reprod. Dev.* 66, 349-357.
- Mortimer, S.T., 2000. CASA-practical aspects. *J. Androl.* 21, 515-524.
- Nasrin, S.J., Calogero, S., 2012. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *J. Androl.* 33, 536-551.
- O'Hara, L., Hanrahan, J.P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A.C., Lonergan, P., 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology* 73, 541-549.

- Paulenz, H., Soderquist, L., Adnoy, T., Soltun, K., Sæther, P.A., Fjellsøy, K.R., Andersen Berg, K., 2005. Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. *Anim. Reprod. Sci.* 86, 109-117.
- Pellicer-Rubio, M.T., Magallon, T., Combarous, Y., 1997. Deterioration of goat sperm viability in milj extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.* 57, 1023-1031.
- Pellicer-Rubio, M.T., Combarous, Y., 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J. Reprod. Fertil.* 112, 95-105.
- Perez-Pe, R., Cebrian-Perez, J.A., Muino-Blanco, T., 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology* 56, 425-434.
- Ritar, A.J., Salamon, S., 1991. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Rumin. Res.* 4, 29-37.
- Roca, J., Martinez, E., Vazquez, J.M., 1993. Seasonal variation in fructose and citric acid in seminal plasma of Murciano-Granadina goats. *Small Rumin. Res.* 10, 219-226.
- Salamon, S., Maxwell, W.M., 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 77-111.
- Sanz, L., Calvete, J.J., Mann, K., Gabius, H., Töpfer-Petersen, E., 1993. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: A dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 35, 37-43.
- Sawyer, D.E., Brown, D.B., 1995. The use on an in vitro sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. *Reprod. Toxicol.* 9, 351-357.
- Sikka, S.C., Hellstrom, W.J., 2002. Role of oxidative stress and antioxidants in Peyronie's disease. *Int. J. Impot. Res.* 14, 353-360.
- Smith, J.F., Parr, J., Murray, G.R., McDonald, R.M., R.S-F, L., 1999. Seasonal changes in the protein content and composition of ram seminal plasma. *proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 223-225.
- Tuli, R.K., Holtz, W., 1995. Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperate zone. *Theriogenology* 43, 1359-1363.
- Upreti, G.C., Jensen, K., Oliver, J.E., Duganzich, D.M., Munday, R., Smith, J.F., 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 48, 269-278.
- Upreti, G.C., Hall, E.L., Koppens, D., Oliver, J.E., Vishwanath, R., 1999. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 56, 107-121.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.
- Villemure, M., Lazure, C., Manjunath, P., 2003. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:39.
- Wang, W., Luo, J., Sun, S., Xi, L., Gao, Q., Haile, A.B., Shi, H., Zhang, W., Shi, H., 2015. The Effect of Season on Spermatozoa Motility, Plasma Membrane and Acrosome Integrity in Fresh and Frozen-Thawed Semen from Xinong Saanen Bucks. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 23-28, 1-6.

***Etude 3. Mise au point des protocoles classiques  
d'induction et de synchronisation d'œstrus et  
d'ovulation chez la chèvre Beni Arouss***

Cette étude est présentée sous forme d'article en cours d'acceptation au journal *Reproduction in Domestic Animals*.

**Evaluation of different hormonal treatments on oestral and ovarian responses in Moroccan Beni Arouss goats during anoestrus and breeding season**

**Sara El Kadili<sup>1,2</sup>, Marianne Raes<sup>1</sup>, Jean-Loup Bister<sup>1</sup>, Jean-François Beckers<sup>4</sup>, Gaston Amzati<sup>1</sup>, Bouchaib Archa<sup>2</sup>, Mouad Chentouf<sup>3</sup>, Nathalie Kirschvink<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> University of Namur, Faculty of Sciences, Department of Veterinary Medicine, Integrated Veterinary Research Unit, Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium. Email (corresponding author): nathalie.kirschvink@unamur.be

<sup>2</sup> Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès, Department of Animal Production, Route Haj Kaddour, BP. S/40, 50001 Meknes, Morocco. Email (corresponding author): s.elkadili@gmail.com

<sup>3</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, Regional Center of Tangier, Bd Sidi Mohamed Ben abdellah 78, 90010 Tangier, Morocco.

<sup>4</sup> University of Liege, Faculty of Veterinary Medicine, Bd de Colonster 20 B41, B-4031 Liège, Belgium.

## Présentation de l'étude

Les études 1 et 2 réalisées sur les boucs de la race Beni Arouss suggèrent que la reproduction naturelle ainsi que l'insémination avec de la semence fraîche ou conservée à 16°C pendant un maximum de 24 heures sont prometteuses. Dès lors, il est important de disposer d'un protocole optimal d'induction et de synchronisation de l'œstrus et de l'ovulation chez la chèvre Beni Arouss. L'objectif de cette 3ème étude était d'évaluer l'efficacité de huit combinaisons d'acétate de fluorogestone (FGA, 20 ou 40 mg comme éponge vaginale insérée pendant 11 jours), de gonadotrophine chorionique équine (eCG, 300 ou 500 UI injectée 48 heures avant le retrait d'éponge) et de PGF2alpha (cloprosténol, 0 ou 50 µg injectée 48h avant le retrait d'éponge) pour l'induction et la synchronisation d'œstrus et d'ovulation chez la chèvre Beni Arouss en anœstrus saisonnier (printemps, n=64) et en saison sexuelle (automne, n=58). Entre 12 et 60 h après le retrait des éponges, les chèvres ont été exposées aux boucs équipés de tabliers marqueurs (1bouc/groupe) pour la détection des chaleurs. Des prélèvements sanguins permettant de déterminer le moment du pic pré-ovulatoire de LH et l'augmentation de la progestérone en tant que signe d'un corps jaune actif ont été effectués respectivement entre 20 et 60 heures et 3, 5, 8 et 15 jours après le retrait de l'éponge. D'après les résultats, aucun effet de la saison (printemps par rapport à l'automne) sur la réponse œstrale (95% contre 93%,  $p > 0,05$ ), le pic pré-ovulatoire de LH (94% contre 84%,  $p > 0,05$ ) et la réponse lutéale après 3 à 8 j et après 11 à 15 j après fin de traitement (respectivement 92% contre 66% et 92% contre 98% ;  $p > 0,05$ ) n'a été enregistré. L'induction d'œstrus (21 [13-53] vs 32 [12-54] heures ;  $P < 0,05$ ) et du pic pré-ovulatoire de LH (26 [20-60] vs 38 [22-60] heures ;  $P < 0,05$ ) a été plus tardive en automne qu'au printemps. En automne, l'utilisation d'éponges imprégnées de 40 mg de fluorogestone a retardé significativement plus la réponse œstrale (36 [16-54] vs 23 [12-47] heures ;  $P < 0,05$ ) et le pic pré-ovulatoire de LH (44 [26-58] vs 33 [22-60] heures ;  $P < 0,05$ ) par rapport à l'utilisation de 2mg de fluogestone. Des différences significatives en fonction du traitement ont été enregistrées pour le délai de pic de LH (au plus tôt pour 20 mg de FGA, 300 UI d'eCG, 50 µg de PGF2alpha) et l'induction de la phase lutéale (au plus tard pour 40 mg de FGA, 300 UI d'eCG, 50 µg de PGF2alpha).

En conclusion, l'ensemble des traitements hormonaux appliqués ont été efficaces pour induire et synchroniser l'œstrus et l'ovulation en période d'anœstrus et en saison sexuelle chez la chèvre Beni Arouss. La saison a influencé significativement l'induction d'œstrus et du pic pré-ovulatoire de LH et l'utilisation des éponges imprégnées de 40 mg a retardé significativement la réponse ovarienne en saison sexuelle. Le protocole consistant en une application de 20 mg de FGA associée à 300 UI d'eCG et de 50 µg de PGF2alpha semble être le plus adéquat étant donné qu'il fait preuve d'une efficacité élevée en contre-saison et en saison de reproduction tout en réduisant les doses utilisées des différentes hormones.

## Abstract

The efficacy of eight combinations of fluorogestone acetate (FGA, 20 or 40 mg as intravaginal device during 11 days), equine chorionic gonadotropin (eCG, 300 or 500 UI injected 48 hours before FGA removal) and prostaglandin F<sub>2α</sub> (cloprostenol, 0 or 50 µg injected 48h before FGA removal) aiming at induction and synchronization of oestrus and ovulation was evaluated during the anoestrus season in spring and during the breeding season in autumn in adult Beni Arouss goats. Oestrus behaviour was recorded between 12 and 60 hours after FGA removal. Blood samplings allowing to assess onset of the preovulatory LH surge and increase of progesterone as sign of an active *corpus luteum* were performed respectively between 20 and 60 hours and 3, 5, 8 and 15 days after FGA removal. No season-related differences (spring *versus* autumn) were observed for oestrus response (95 *versus* 93%), preovulatory LH surge (94 *versus* 84%) and luteal response after 3 to 8 and 11 to 15 days post-treatment (respectively 92 *versus* 66 % and 92 *versus* 98%). The onset of oestrus (21 [13-53] *versus* 32 [12-54] hours) and LH surge (26 [20-60] *versus* 38 [22-60] hours) occurred significantly later in autumn. FGA (40 *versus* 20 mg) in autumn significantly delayed the onset of oestrus (36 [16-54] *versus* 23 [12-47] hours) and LH surge (44 [26-58] *versus* 33 [22-60] hours). Significant treatment-related differences were recorded for onset of LH surge (earliest for 20 mg FGA, 300 IU eCG, 50 µg PGF<sub>2α</sub>) and onset of luteal phase (latest for 40 mg FGA, 300 IU eCG, 50 µg PGF<sub>2α</sub>).

In conclusion, the hormone combinations tested appeared equally effective in terms of oestrus and ovulation rates. Season has influenced significantly the onset of oestrus and LH surge and the high dose regimen of FGA delayed the ovarian response in autumn.

**Keywords:** Hormonal treatment; goat; anoestrus; breeding season; oestrus; LH surge.



## **Introduction**

In the Northern of Morocco, goat farming despite its low productivity contributes at 70% to rural population incomes (Chentouf et al., 2011) and therefore plays an important socio-economic role. To improve livestock farms productivity and hence goat producers' income, a genetic improvement program of local goats is highly needed.

Beni Arouss is an indigenous North Moroccan goat breed, recently recognized by Moroccan Ministry of Agriculture (official Journal of Kingdom of Morocco; No. 6430; 01/2016) whose name was derived from the geographical location. This breed is characterized by a good milk production performance (El Otmani et al., 2014) and an excellent adaptation to local conditions and resistance to pests and diseases. Presently, this breed is under a breeding program aiming to preserve and improve its production potential. Artificial insemination is critical to support this program by accelerating the identification of superior bucks at younger age and dissemination of the genetic progress.

The seasonality of reproduction in Beni Arouss goats impacts negatively on productivity and consequently on the management of animal products availability (Chentouf et al., 2011). The breeding season begins approximately in July and peaks from September to December. A seasonal anoestrus was recorded from April to June (Chentouf et al., 2011). In order to control reproduction and to accompany the goat breeding program in this region, the development of hormonal protocols to induce and synchronize oestrus during anoestrus season but also during the breeding season is necessary. Indeed, no protocol adapted to the local goat breeds is available.

The routine protocol used for induction and / or synchronization of oestrus in goats is 11 days of treatment with intravaginal progesterone sponges impregnated with fluorogestone acetate (FGA) and intramuscular injection of equine chorionic gonadotropin (eCG) and prostaglandin (PGF<sub>2α</sub>) or its analogues 48 hours prior to sponge removal (Baril et al., 1992; Freitas et al., 1996a,b; Freitas et al., 1997; Leboeuf et al., 2000; Leboeuf et al., 2003). This protocol is effective during both seasons. Two doses of FGA that are commonly used for synchronization and/or induction of oestrus in goats are 20 and 40 mg of FGA. In their study, Leboeuf et al. (2003) found that both dose regimens are equally effective for the induction of oestrus, ovulation and fertility, leading to the use of the lowest dose. Beni Arouss goat has a little size with an average adult body weight of 37.5 kg (Hilal et al., 2013) and an average milk production of 0.5 kg per day (El Otmani et al., 2013). Depending on milk production and season, Leboeuf et al. (2000) recommended for French breeds a dose of eCG varying from 400 to 600 IU in combination with 50 µg of cloprostenol. Up to now, the most appropriate treatment combination for Beni Arouss goats is still unknown.

The objective of this study was to compare eight treatment combinations of FGA, eCG and PGF<sub>2α</sub> used in spring and autumn in Beni Arouss goats. Prevalence and time point of onset of oestrus behaviour, preovulatory LH (luteinising hormone) surge and luteal phase after treatment were used as parameters to compare treatments efficiency.

## Material and methods

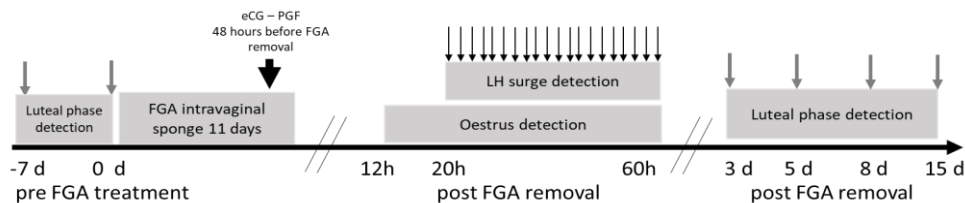
### *Animals and management*

The study was carried out at the experimental station of INRA, Regional Center of Tangier, located at the North of Morocco (latitude 35°44'N, longitude 5°54' O), during the period of anoestrus (spring) and during the breeding season (autumn).

In both studies, the goats were maintained in a semi-intensive system under natural photoperiod. Oat hay and concentrate feed mixture were distributed once a day according to the maintenance requirements (INRA, 1988) with water and mineral salt available *ad libitum*. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee at INRA.

### *Study design and treatments*

This first part of the study was conducted during the month of April, characterized as anoestrus season in Beni Arouss goat (Chentouf et al., 2011). The second part of the study was performed during November of the same year. The study design as depicted in Figure 1 was used at both time points and the number of goats enrolled for each hormonal treatment combination is shown in Table 1. A total of 64 (in spring) and 58 (in autumn) non-lactating adult Beni Arouss goats were randomly assigned to eight treatments according to their age ( $5.0 \pm 1.0$  years) and body weight ( $30.0 \pm 4.1$  kg). Treatment combinations were based on dose of FGA (40 and 20 mg applied as vaginal sponge during 11 days; Chronogest LC<sup>®</sup>, Intervet, France), eCG dose (300 or 500 IU administered intramuscularly 48 hours before FGA sponge removal; Synchro-part, Ceva, Morocco) and use or non-use of PGF<sub>2α</sub> (0 or 50 µg administered intramuscularly 48 hours before FGA sponge removal; Estrumate<sup>®</sup>, MSD animal Health, Morocco).



**Fig. 1.** Timeline of the study design

**Table 1.** Beni Arouss goat group size for each oestrus induction/synchronization treatment.

Season	FGA	eCG	PGF <sub>2α</sub>	animals planned per group
Spring (n=64)	40 mg	300 IU	0 µg	8
			50 µg	8
		500 IU	0 µg	8
			50 µg	8
	20 mg	300 IU	0 µg	8
			50 µg	8
		500 IU	0 µg	8
			50 µg	8
Autumn (n=58)	40 mg	300 IU	0 µg	7
			50 µg	7
		500 IU	0 µg	7
			50 µg	8
	20 mg	300 IU	0 µg	7
			50 µg	7
		500 IU	0 µg	7
			50 µg	8

FGA, fluorogestone acetate; eCG, equine chorionic gonadotropin; PGF<sub>2α</sub>, prostaglandin F<sub>2α</sub>.

#### *Blood samples and progesterone assays*

Blood samples were collected from all goats via the jugular vein using 9 ml heparinized vacutainer tubes. To establish the reproductive status of goats, blood samples were collected 7 days before sponge insertion, the day of sponge insertion and 3, 8, 11 and 15 days after sponge removal. Plasma was separated by centrifugation at 800 g for 20 min, transferred into 1.5 ml microcentrifuge tubes and stored at -20°C until analysis. Progesterone (P4) concentrations were measured in duplicate using a commercial ELISA kit (Human DS-EIA-Steroid-Progesterone, DSI, Italy). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 3 % and 9.4% respectively. Goats were in luteal phase when their plasma progesterone concentration was higher than 2 ng/ml at two successive blood samplings. They were in anoestrus if the samples performed at -7 and 0 days before FGA treatment revealed progesterone concentrations below 2 ng/ml.

#### *Oestrus detection*

In both seasons and in each group, the occurrence of behavioural oestrus signs was monitored between 12 and 60 hours after FGA sponge removal by using one buck per treatment group equipped with a plastic apron and a colour harness. Animals were observed by two same investigators at 2 hours intervals. The goats were in oestrus only if they stood while be mounted by the bucks and displayed colour marks left by the bucks' harness.

*Preovulatory LH surge*

Blood samples were collected by jugular venipuncture every 2h from 20 to 60h after sponge removal. Plasma was separated by centrifugation (800 g for 20 min) and stored at -20°C until use. LH concentrations were determined in duplicate samples using a commercial ELISA kit (LH Detect, Repropharm, INRA, France). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 4.3 and 4.4%, respectively. Onset of preovulatory LH surge was determined as the time of the maximum LH concentration with at least a fivefold amount of the basal LH concentration.

*Statistical analysis*

Based on plasma progesterone analysis performed on samples collected prior to hormonal treatment (-7 and 0 days before FGA treatment), goats displaying ovarian activity in spring (n=1) and goats displaying absence of ovarian activity in autumn (n=14) were excluded from the dataset. The number and proportion of animals within each season and each treatment group displaying signs of oestrus, a preovulatory LH surge and onset of a luteal phase after 3 to 8 and after 11 to 15 days after FGA sponge removal were calculated. The interval between FGA sponge removal and onset of oestrus and LH surge was recorded for each animal and expressed as medians with their minimum and maximum in function of season and dose regimens.

Descriptive statistics for all the data were calculated. The Shapiro-Wilk test was used to verify the data normality. Non-normal quantitative data were analyzed by means of the Kruskal-Wallis variance analysis with season or treatment as main effects. Medians are compared by Wilcoxon sum rank test. Frequency data were assessed by the Fisher's exact test.

For all tests, the R statistical software (version 3.5.1) was used. The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

**Results**

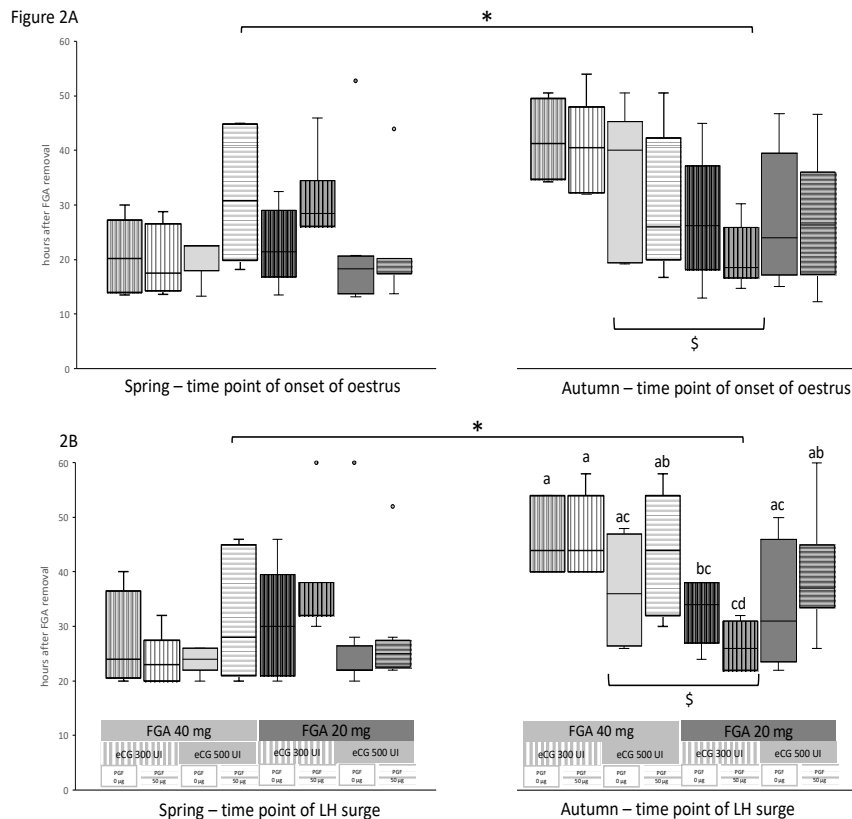
Results of season- and treatment-related differences for oestrus response, preovulatory LH surge and onset of luteal phase are shown in Table 2. No season-related differences (spring *versus* autumn) were recorded for oestrus response (95% *versus* 93%,  $P > 0.05$ ), preovulatory LH surge (94% *versus* 84%,  $P > 0.05$ ) and luteal response after 3 to 8 and after 11 to 15 days after treatment (respectively 92% *versus* 66 % and 92 % *versus* 98%;  $P > 0.05$ ). Treatment-related differences were observed in autumn during the breeding season where the percentage of goats displaying a luteal phase within 3 to 8 days after sponge removal was significantly reduced after the 40 mg FGA, 300 IU eCG and 50 µg PGF<sub>2α</sub> treatment as compared with 20 mg FGA and 300 or 500 IU eCG treatment ( $P < 0.05$ ). All treatments including the 40 mg FGA dose regimen used in autumn tended to a delayed onset of the luteal phase. Although non-significant, absence of PGF<sub>2α</sub> treatment in autumn further tended to decrease the rate of LH surges occurring within 60h after FGA sponge removal (Table 2).

**Table 2.** Treatment effect on oestrus induction, preovulatory LH surge and onset of luteal phase within 8 and 15 days post FGA removal. Data are shown as absolute numbers and proportions of responding goats.

Season	FGA	eCG	PGF <sub>2α</sub>	Animals per group	Oestrus detected	LH surge	Luteal phase after 3-8 days	Luteal phase after 11-15 days
Spring (n=64)	40 mg	300 IU	0 µg	8	100%	100%	100%	100%
			50 µg	8	100%	100%	100%	100%
		500 IU	0 µg	8	88%	88%	100%	100%
			50 µg	7	86%	71%	71%	71%
	20 mg	300 IU	0 µg	8	100%	100%	88%	88%
			50 µg	8	88%	88%	88%	88%
		500 IU	0 µg	8	100%	100%	100%	100%
			50 µg	8	100%	100%	88%	88%
Autumn (n=58)	40 mg	300 IU	0 µg	5	80%	60%	40% ab	80%
			50 µg	5	100%	100%	20% b	100%
		500 IU	0 µg	6	83%	67%	50% ab	100%
			50 µg	5	100%	100%	40% ab	100%
	20 mg	300 IU	0 µg	6	100%	83%	100% a	100%
			50 µg	5	100%	100%	80% ab	100%
		500 IU	0 µg	6	83%	67%	100% a	100%
			50 µg	6	100%	100%	83% ab	100%

FGA, fluorogestone acetate; eCG, equine chorionic gonadotropin; PGF<sub>2α</sub>, prostaglandin F<sub>2α</sub>. Data of a same column with different superscripts significantly differ ( $P < 0.05$ ).

Figure 2A and 2B show the onset of oestrus and LH surge in spring and autumn and in function of each treatment regimen. Oestrus occurred significantly later in autumn than in spring (32 [12-54] *versus* 21 hours [13-53] ;  $P < 0.05$ ), as well as LH surge (38 [22-60] *versus* 26 [20-60] hours;  $P < 0.05$ ). FGA doses of 40 mg (*versus* 20 mg) used in autumn significantly delayed the onset of oestrus (36 [16-54] *versus* 23 [12-47] hours;  $P < 0.05$ ) and LH surge (44 [26-58] *versus* 33 [22-60] hours;  $P < 0.05$ ). A significant treatment-related difference was recorded for onset of LH surge (earliest for 20 mg FGA, 300 IU eCG, 50 µg PGF<sub>2α</sub>) and onset of luteal phase (latest for 40 mg FGA, 300 IU eCG, 50 µg PGF<sub>2α</sub>).



**Fig. 2.** Onset of oestrus (A) in spring and autumn and time point of LH surge recorded in spring and autumn (B) in Beni Arouss goats after treatment combinations of FGA, eCG and PGF<sub>2α</sub>. Results are expressed in hours (median with minim and maximum) in function of treatment combination. \* indicates a significant season-related difference ( $P < 0.05$ ). \$ indicates a FGA dose-related difference ( $P < 0.05$ ). Box plots with different letters indicate significant treatment-related differences within a same season ( $P < 0.05$ ).

## Discussion

In small ruminants, oestrus induction and/or synchronization protocols are used for genetic improvement and to manage reproductive activity over the year. Beside the efficiency in terms of ovulation rate, the variability of the time points of onset of oestrus, LH surge and development of *corpus luteum* are important parameters for AI protocols. Indeed, the ideal time point for single or repeated IA is predetermined without a need for oestrus detection (Leboeuf et al., 2000; Menchaca et Rubianes, 2004).

The present study comes up with original results allowing to characterise (1) the induction rates of oestrus, LH surge and *corpus luteum* and (2) the variability of onset of oestrus, LH surge and *corpus luteum* in function of the season (spring *versus* autumn) after eight FGA-eCG-PGF<sub>2α</sub> treatment combinations in Beni Arouss goats. Before discussing the major findings of this study, some drawbacks need to be addressed: as several goats did not respond to the inclusion criteria of seasonal anoestrus in spring (ie absence of luteal phase prior FGA treatment) or cyclicity in autumn (ie presence of luteal phase prior FGA treatment), the group

sizes decreased, thereby reducing somewhat the statistical power. Another point concerns the animals used during spring and autumn: around 60% of the goats were used at both occasions, whereas others had been replaced by new animals. Consequently, a pairwise evaluation of treatment efficiency could not be performed.

The eight treatments used in this study were found equally effective in inducing oestrus in Beni Arouss goats during the anoestrus and the breeding season. Within 60 hours after sponge removal, there were no significant differences between treatment groups in terms of oestrus response (Table 2). During anoestrus and the breeding season, a high oestrus rate was observed following sponge removal (95% and 93%, respectively). This was within the range of 82 to 100% reported in studies using treatments with FGA or MAP intravaginal sponges maintained for 9, 11 or 14 days plus an intramuscular injection of eCG and PGF 48, 24 or 0 h prior to sponge withdrawal (Freitas et al., 1996b; Leboeuf et al., 2003; Amarantidis et al., 2004; Dogan et al., 2004; Dogan et al., 2005; Fonseca and Torres, 2005; Modu-Bukar et al., 2012; Omontese et al., 2013; Pietroski et al., 2013; Dogan et al., 2016), or only using intravaginal sponges with eCG (Montlomo et al., 2002; Amarantidis et al., 2004; Blaszczyk et al., 2004; Lohloenya et al., 2005). During anoestrus, the overall oestrus response reported in our study was higher than what is reported when this protocol was applied to synchronize oestrus in the North African Maure goat in Tunisia (75%) (Rekik et al., 2014).

During anoestrus, there is no significant differences in onset of oestrus between groups. The oestrus response occurred between 13 and 53 hours after sponge removal (median value: 21 hours), with the highest percentage of females in oestrus observed between 13 and 44 hours (97%). The results of our trial showed a poor agreement with previous findings of Zarazaga et al. (2014), where the onset of oestrus occurred after  $24 \pm 0.4$  h. Leboeuf et al. (2003) reported that the oestrus occurred between 18 and 30 h after using sponge impregnated with 20 or 40 mg FGA combined to 500 IU of eCG and 50 µg of cloprostenol. However, a similar range of oestrus onset (20 to 44 hours) was reported by Freitas et al. (1996b) using sponges impregnated with 40 mg FGA combined to 500 IU of eCG and 50 µg of cloprostenol. Variations in oestrus response as observed in this study compared to previous reports could be due to differences in breed, location, nutrition, age, parity and management (Wildeus, 2000; Whitley and Jackson, 2004; Simões et al., 2008). It can be hypothesized that seasonal anoestrus is less pronounced in does kept under optimal feeding and housing conditions than under field conditions.

The results of onset of oestrus recorded during the breeding season showed no significant differences between treatment groups and are in line with previous studies reporting onset of oestrus between 18 and 60 hours (Dogan et al. 2016), 18 and 66 hours (Dogan et al. 2005), 18 to 30 hours (Leboeuf et al., 2003) and around 29.4 ( $\pm 1.4$ ) hours (Zarazaga et al. 2014). However, a FGA dose effect was found: onset of oestrus was significantly delayed when treatment combinations including 40 mg of FGA were used (Figure 2A). Similar results were reported by other authors (Crosby et al., 1991; Greyling et al., 1997). Moreover, the onset of oestrus after sponge removal in goats investigated in autumn during their breeding season was significantly delayed when compared to oestrus onset recorded in spring during the period of anoestrus. The most likely explanation for this difference is an increased progesterone-mediated negative feedback of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis leading to a delayed onset of oestrus after FGA withdrawal in autumn (Freitas et al., 1996a). This negative feedback seems further enhanced by 40 mg FGA sponges.

During both seasons, a high preovulatory LH surge response was recorded (94 % and 84 % respectively in anoestrus and breeding season) regardless of the regimen treatment. During

the anoestrus season, the overall percentage of females displaying LH surge reported was similar to that recorded in dairy goats treated, during both seasons, with the same protocol (Leboeuf et al., 2003). By the use of 20 mg FGA, 450 IU of eCG and 6 mg of luprostiol, Zarazaga et al. (2014) found that all the goats treated during anoestrus and in the breeding season displayed a preovulatory LH surge. Although non-significant, a reduced rate of LH surges observed within 60 hours after FGA sponge removal was recorded in goats that did not received PGF<sub>2α</sub> during their reproduction period in autumn (Table 2). As almost all goats developed later a *corpus luteum*, it is likely that LH surges in goats without PGF<sub>2α</sub> treatment occurred after the 60 hours sampling period. Previous studies reported that prostaglandin is effective during the breeding season as a synchronizing agent responsible for luteolysis after priming with FGA (Greyling and Van, 1991; Romano, 1996; Amarantidis et al., 2004).

In the present study, the interval from sponge removal to the preovulatory LH surge was ranged from 20 to 60 hours in most animals. During the period of anoestrus, LH surge occurred significantly earlier than during autumn (Figure 2B). Our results are in line with those reported by Zarazaga et al. (2014) in Blanca Andaluza goats where the interval between 20 mg FGA sponge removal and preovulatory LH surge was of 29.3 h ( $\pm 0.6$ ) during anoestrus *versus* 35.9 h ( $\pm 1.8$ ) during the breeding season. No effect of regimen treatment was evidenced in spring (Figure 2B), but as for onset of oestrus, high dose FGA sponges (40 mg) led to a delayed LH surge in autumn (Figure 2B). These observations are in agreement with earlier studies (Leboeuf et al. 2003) and in line with the above-mentioned progesterone-mediated negative feedback. Further significant differences between treatments performed in autumn were found. Even these results warrant confirmation by enrolling a larger number of goats, it is worth to mention that the 20 mg FGA, 300 IU eCG, 50  $\mu$ g PGF<sub>2α</sub> treatment induced the most rapid and best synchronised LH surge (occurring between 22 and 32 hours after sponge removal) (Figure 2B).

Onset of a functional *corpus luteum* seemed delayed during the breeding period and an FGA dose effect was detected as for onset of oestrus and LH surge (Table 2). Although non-significant, the percentage of goats that did not develop *corpus luteum* was slightly lower (92 % versus 98 %) in spring than in autumn. This absence of ovulation (despite a LH surge) may be related to insufficient luteinizing hormone released by the pituitary, a poor ovarian response to eCG or individual variation in responsiveness to eCG by goats (Rubianes and Menchaca, 2003).

## Conclusion

In conclusion, the hormone combinations used in the present study were equally efficient in inducing oestrus and ovulation in Beni Arouss goats during the anoestrus and in the breeding season. The 20 mg FGA, 300 IU eCG, 50  $\mu$ g PGF<sub>2α</sub> treatment induced the best synchronised ovulation in both seasons. Season- and FGA dose-related effects lead to a delayed ovarian response in autumn. No eCG dose-effect was evidenced, whereas PGF<sub>2α</sub> should be recommended when oestrus induction is performed during the reproduction period.

## Conflict of interest

The authors confirm that there are no conflicts of interests.



## **Acknowledgments**

This research was supported by the Belgian Academy for Research and Higher Education-Development Cooperation Committee (ARES-CCD). It was conducted at INRA, Regional Center of Tangier. The authors thank staff of this center for their assistance with animal handling and care during experimentations.

## **References**

- Ahmed, M.M.M., Makawi, S.E., Jubara, A.S. (1998). Synchronization of oestrus in Nubian goats. *Small Ruminant Research*, 30, 113-120.
- Amarantidis, I., Karagiannidis, A., Saratsis, P., Brikas, P. (2004). Efficiency of methods used for estrous synchronization in indigenous Greek goats. *Small Ruminant Research*, 52, 247-252.
- Baril, G., Remy, B., Vallet, J.C., Beckers, J.F. (1992). Effect of Repeated Use of Progestagen-PMSG Treatment for Estrus Control in Dairy Goats out of Breeding Season. *Reproduction in Domestic Animals*, 27, 161-168.
- Blaszczyk, B., Udala, J., Gaczarzewicz, D. (2004). Changes in estradiol, progesterone, melatonin, prolactin and thyroxine concentrations in blood plasma of goats following induced estrus in and outside the natural breeding season. *Small Ruminant Research*, 51, 209-219.
- Chentouf, M., Bister, J.L., Boulanouar, B. (2011). Reproduction characteristics of North Moroccan indigenous goats. *Small Ruminant Research*, 98, 185-188.
- Crosby, T.F., Boland, M.P., Gordon, I. (1991). Effect of progestagen treatments on the incidence of oestrus and pregnancy rates in ewes. *Animal Reproduction Science*, 24, 109-118.
- Dogan, I., Nur, Z., Gunay, U., Soylu, M.K., Sonmez, C. (2004). Comparison of fluorogestone and medroxyprogesterone intravaginal sponges for oestrus synchronization in Saanen does during the transition period. *South African Journal of Animal Science*, 34, 18-22.
- Dogan, I., Nur, Z., Gunay, U., Sagirkaya, H., Soylu, M.K., Sonmez, C. (2005). Estrous synchronization during the natural breeding season in Anatolian black does. *Veterinary Medicine*, 50, 33-38.
- Dogan, I., Nur, Z., Dogan, S. (2016). Different progestagen treatment duration on estrous synchronization during the natural breeding season in non-lactating Anatolian black goats. *Animal Reproduction*, 13, 806-810.
- El Otmani, S., Hilal, B., Chentouf, M. (2013). Milk production and composition of 'Beni Arous' North Moroccan local goat. *Options Méditerranéennes* 108, 457-461.
- El Otmani, S., Hilal, B., Chentouf, M. (2014). Milk production and composition of 'Beni Arousse' North Moroccan local goat, 39th ICAR Session, Berlin (Germany).
- Fonseca, J.F., Torres, C.A. (2005). Administration of hCG 5 days after breeding and reproductive performance in nulliparous dairy goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 40, 495-499.
- Freitas, V.J.F., Baril, G., Bosc, M., Saumande, J. (1996a). The influence of ovarian status on response to estrus synchronization treatment in dairy goats during the breeding season. *Theriogenology*, 45, 1561-1567.
- Freitas, V.J.F., Baril, G., Saumande, J., 1996b. Induction and synchronization of estrus in goats: The relative efficiency of one versus two Fluoregestone Acetate impregnated vaginal sponges. *Theriogenology* 46, 1251-1256.
- Freitas, V.J., Baril, G., Saumande, J. (1997). Estrus synchronization in dairy goats: use of fluorogestone acetate vaginal sponges or norgestomet ear implants. *Animal Reproduction Science*, 46, 237-244.
- Greyling, J.P.C., Van, N.C.H. (1991). A different synchronization technique in Boer does outside the normal breeding season. *Small Ruminant Research*, 5, 233-243.

- Greyling, J.P.C., Erasmus, J.A., Taylor, G.J., Van der Merwe, S. (1997). Synchronization of estrus in sheep using progestagen and inseminating with chilled semen during the breeding season. *Small Ruminant Research*, 26, 137–143.
- Hilal, B., El Otmani, S., Chentouf, M., Boujenane, I. (2013). Morphological characterization of the local goat population 'Beni Arouss'. *Options Méditerranéennes* 108, 433-437.
- INRA. (1988). *Alimentation des bovins, ovins et caprins*, Jarrige, E.R. (Ed.), INRA, Paris. pp. 150-151.
- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. (2000). production and storage of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62, 113-141.
- Leboeuf, B., Forgerit, Y., Bernelas, D., Pougard, J.L., Senty, E., Driancourt, M.A. (2003). Efficacy of two types of vaginal sponges to control onset of oestrus, time of preovulatory LH peak and kidding rate in goats inseminated with variable numbers of spermatozoa. *Theriogenology* 60, 1371-1378.
- Lohloenya, K.C., Greyling, J.P.C., Schwalbach, L.M. (2005). Reproductive performance of South African indigenous goats following oestrous synchronisation and AI. *Small Ruminant Research*, 57, 115-120.
- Menchaca, A.; Rubianes, E. (2004). New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility, and Development*, 16, 403-413.
- Menegatos, J., Chadio, S.E., Karatzas, G., Stoforos, E. (1995). Progesterone levels throughout progestagen treatment influence the establishment of pregnancy in the goat. *Theriogenology* 43, 1365-1370.
- Montlomo, K.C., Greyling, J.P.C., Schwalbach, L.M. (2002). Synchronisation of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments. *Small Ruminant Research*, 45, 45–49.
- Omontese, B.O., Rekwot, P.I., Makun, H.J., Ate, I.U., Rwuaan, J.S., Kawu, M.U. (2013). Oestrus induction using fluorogestone acetate sponges and equine chorionic gonadotrophin in Red Sokoto goats. *South African Journal of Animal Science*, 43.
- Pietroski, A.C., Brandao, F., Souza, J.M., Fonseca, J.F. (2013). Short, medium or long-term hormonal treatments for induction of synchronized estrus and ovulation in Saanen goats during the nonbreeding season. *Revista brasileira de zootecnia*, 42, 168-173.
- Rekik, M., Ben Othmane, H., Lassoued, N., Sakly, C. (2014). Efficiency of Oestrous Synchronization by GnRH, Prostaglandins and Socio-Sexual Cues in the North African Maure Goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 499-504.
- Romano, J.E. (1996). Comparison of fluorogestone and medroxyprogesterone intravaginal pessaries for estrus synchronization in dairy goats. *Small Ruminant Research*, 22, 219-223.
- Romano, J.E. (2002). Does in proestrus-estrus hasten estrus onset in does estrous synchronized during breeding season. *Applied Animal Behaviour Science*, 77, 329-334.
- Rubianes, E., Menchaca, A. (2003). The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*, 78, 271-287.
- Simoes, J., Baril, G., Almeida, J. C., Azevedo, J., Fontes, P. and Mascarenhas, R. (2008). Time of ovulation in nulliparous and multiparous goats. *Animal* 2(5), 761-68.
- Whitley, N.C., Jackson, D.J. (2004). An update on estrus synchronization in goats: A minor species. *Journal of Animal Science*, 82, 270–276.
- Wildeus, S. (2000). Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *Journal of Animal Science*, 77, 1–14.
- Zarazaga, L.A., Gatica, M.C., Gallego-Calvo, L., Celi, I., Guzman, J.L. (2014). The timing of oestrus, the preovulatory LH surge and ovulation in Blanca Andaluza goats synchronised by intravaginal progestagen sponge treatment is modified by season but not by body condition score. *Animal Reproduction Science*, 146, 170-175.

***Etude 4. Mise au point d'un protocole alternatif  
d'induction et de synchronisation d'ovulation chez la  
chèvre Beni Arouss***

Cette étude est présentée sous forme d'article et n'a pas encore fait l'objet de publication  
dans une revue

**Response to the sexually active buck effect in Beni Arouss goats primed with progestagens during the anoestrus and breeding seasons**

**Sara El Kadili<sup>1,2</sup>, Marianne Raes<sup>1</sup>, Jean-Loup Bister<sup>1</sup>, Jean-François Beckers<sup>4</sup>, Gaston Amzati<sup>1</sup>, Bouchaib Archa<sup>2</sup>, Mouad Chentouf<sup>3</sup>, Nathalie Kirschvink<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> University of Namur, Faculty of Sciences, Department of Veterinary Medicine, Integrated Veterinary Research Unit, Namur Research Institute for Life Sciences (NARILIS), Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium. Email (corresponding author): nathalie.kirschvink@unamur.be

<sup>2</sup> Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès, Department of Animal Production, Route Haj Kaddour, BP. S/40, 50001 Meknes, Morocco. Email (corresponding author): s.elkadili@gmail.com

<sup>3</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, Regional Center of Tangier, Bd Sidi Mohamed Ben abdellah78, 90010 Tangier, Morocco.

<sup>4</sup> University of Liege, Faculty of Veterinary Medicine, Bd de Colonster 20 B41, B-4031 Liège, Belgium.

## Présentation de l'étude

Bien que l'étude 3 ait permis de définir un protocole d'induction et de synchronisation potentiellement applicable dans un centre d'IA, la présente étude a pour objectif de tester un protocole alternatif testant l'efficacité de l'effet bouc chez la chèvre Beni Arouss.

Cette 4ème étude a pour but d'évaluer l'effet bouc en guise de remplacement de l'eCG sur l'induction et la synchronisation d'œstrus et d'ovulation en période d'anœstrus et en saison sexuelle chez la chèvre Beni Arouss. Cinq mois avant le début de l'étude, des boucs mâles ont été traités photopériodiquement avec 75 jours de jours longs (16 h de lumière et 8 h d'obscurité par jour), suivis par un retour à l'éclairement naturel afin de stimuler leur activité sexuelle. En période d'anœstrus et en saison sexuelle, quarante-cinq chèvres ont été assignées en fonction de leur âge et poids vif à trois traitements. Les femelles du 1<sup>er</sup> groupe ont été traitées pendant 11 jours avec des éponges imprégnées de 20 mg d'acétate de fluorogestone (FGA) combinées à 300 UI d'eCG et 50 µg de cloprosténol injectés par voie intramusculaire 48 heures avant le retrait d'éponge. Les chèvres stimulées par l'effet de bouc sexuellement actif dans les 2ème et 3ème groupes ont reçu un traitement alternatif dans lequel l'injection d'eCG a été remplacée par des mâles sexuellement actifs introduits 2 jours avant (groupe 3) ou au moment du retrait d'éponge (groupe 2) et ont été laissés avec les femelles pendant 3 jours. Entre 20 et 80 h après le retrait d'éponges, les chèvres des groupes 2 et 3 ont été observées pour la détection des chaleurs induites par les boucs (2 boucs par groupe). Des prélèvements sanguins permettant de déterminer le moment du pic pré-ovulatoire de LH et l'augmentation de la progestérone en tant que signe d'un corps jaune actif ont été effectués respectivement entre 20 et 80 heures et 3, 5, 8 et 15 jours après le retrait d'éponges chez les animaux des 3 groupes.

En anœstrus saisonnier, 77% des chèvres induites par l'effet bouc ont été en œstrus à des intervalles allant de 60 à 74 heures après le retrait d'éponge pour le groupe 3 et de 71 à 77 heures pour le groupe 2 ( $P < 0,05$ ). Dans le groupe 1, 77% des chèvres ont eu un pic pré-ovulatoire de LH dans un intervalle allant de 24 à 40 heures après le retrait d'éponge. Cependant, aucune des chèvres induites par l'effet mâle n'a montré un pic de LH endéans les 80 h ayant suivi le retrait d'éponge ni une phase lutéale endéans les 15 jours suivant le retrait d'éponge. 67% des chèvres du groupe 1 ont présenté une phase lutéale dans les 3 à 8 jours suivant le retrait d'éponge, qui s'est maintenue pendant 11-15 j.

Pendant la saison de reproduction, le pourcentage des chèvres en œstrus a atteint 100% dans les groupes soumis à l'effet bouc, avec un délai pour l'apparition des chaleurs allant de 22 à 68 heures après le retrait d'éponge. Dans les trois groupes, la majorité des chèvres ont présenté un pic pré-ovulatoire de LH (84%) à un intervalle allant de 30 à 70 heures après le retrait d'éponge. Le pourcentage des chèvres présentant une phase lutéale dans les 3 à 8 jours suivant le retrait d'éponge n'a pas non plus différé entre les traitements (69% ;  $P > 0,05$ ). Après 11 à 15 jours et sans différence entre groupes, la majorité des chèvres avait ovulé et présentait une phase lutéale (91%).

En conclusion, l'utilisation de l'effet bouc pour induire et synchroniser l'ovulation en période d'anœstrus saisonnier chez les chèvres Beni Arouss traitées avec 20 mg de FGA et 50 µg de cloprosténol n'est pas prometteuse. Cependant, le même protocole apparaît comme une alternative intéressante à l'utilisation de l'eCG pour la synchronisation de l'œstrus et de l'ovulation pendant la saison sexuelle chez les chèvres Beni Arouss.

## **ABSTRACT**

The response to the male effect was studied in Beni Arouss goats during anoestrus and during the breeding season. Prior to anoestrus season, bucks were exposed to artificial long days (16 h of light and 8 h of darkness per day) in individual pens during 75 days (from 14 November to 28 January) followed by a natural photoperiod. Forty- five adult goats during the anoestrus and in the breeding season were assigned to three treatments according to their age and live weight. Goats of group 1 were treated for 11 days with vaginal sponges impregnated with 20 mg of fluorogestone acetate (FGA) combined to 300 IU of eCG and 50 µg of cloprostenol injected intramuscularly 48 h prior to sponge removal. Goats of group 2 and 3 were also treated with 20 mg of FGA and 50 µg of cloprostenol, but eCG injection was replaced by a sexually active buck introduced 0 hours (group 2) or 48 hours (group 3) before FGA removal. Oestrus behavior and preovulatory LH surge were recorded between 20 and 80 hours after FGA sponge removal. The onset of a luteal phase was monitored by plasma progesterone measurement at day 3, 5, 8 and 15 after FGA removal. During the anoestrus season, 77 % of goats induced by the buck effect showed an oestrus at intervals ranging from 60 to 74 hours following sponge removal for group 3 and from 71 to 77 hours for group 2 ( $P < 0.05$ ). In group 1, 77 % of goats displayed a preovulatory LH surge between 24 and 40 hours after sponge removal and 67% developed a luteal phase, but no LH surge or luteal response was detected in goats of group 2 and 3. During the breeding season, oestrus response rate reached 100 % in goats synchronized with the buck effect with an interval ranging from 22 to 68 hours in groups 2 and 3 ( $P > 0.05$ ). In all groups, most of the goats displayed a preovulatory LH surge (84 %) at an interval ranging from 30 to 70 hours following sponge removal ( $P > 0.05$ ). The percentage of females displaying luteal phase within 3 to 8 days from sponge removal did not differ among groups (69 %;  $P > 0.05$ ). After 11 to 15 days, the occurrence of ovulation followed by normal luteal phase was raised in all groups and reached 91 % ( $P > 0.05$ ). In conclusion, the use of bucks failed to induce and to synchronize ovulation in Beni Arouss goats previously treated with 20 mg of FGA and 50 µg of cloprostenol during anoestrus. However, the same protocol appears to be an adequate alternative for oestrus and ovulation synchronization during the breeding season.

**Keywords:** buck effect; goat; anoestrus; breeding season

## **1. Introduction**

In Beni Arouss North Moroccan goat there is an alternation between a breeding season characterized by a succession of oestral cycles and the anoestrus season characterized by an anoestrus and anovulatory periods (From April to last June).

The increasing need for conserving this autochthonous genetic resource (FAO, 2007) and promoting farm productivity and economy necessitates strategies to stimulate Beni Arouss reproductive functions during the anoestrus season and to increase them during the breeding season. These strategies are also required to apply scheduled artificial inseminations (AI) as part of a breeding program.

Many protocols based on the use of progestagens to mimic a luteal phase, and eCG to stimulate ovarian follicular growth are applied to goats. The most efficient one applied to Beni Arouss goat consists in administration of progestagen by use of an intravaginal sponge (20 mg, FGA) for 11 days, followed by an injection of 300 IU eCG and 50 µg cloprostenol 2 days before sponge withdrawal (El Kadili et al., submitted for publication). Although efficient at short term, repeating this treatment bears the risk of decreased fertility as a consequence of anti-eCG antibodies production (Baril et al., 1996; Roy et al., 1999). This limitation combined to the encouragement of farmers by the society to adopt safe practices by reducing or completely avoiding the use of exogenous hormones (Martin et al., 2004) warrants new research aiming to develop alternative methods of oestrus and ovulation synchronization in AI programs.

In small ruminants, and after an isolation period, the stimulation of females by sexually active males previously photostimulated with artificial light induces and synchronizes ovulation in anovulatory goats (Shelton, 1960; Flores et al., 2000; Álvarez and Zarco, 2001; Delgadillo et al., 2001; Delgadillo and Vélez, 2010; Luna-Orozco et al., 2012; Delgadillo et al., 2017). This phenomenon is called 'the buck effect' and it is used in field conditions as non-pharmaceutical manipulation to advance reproductive activity in non-cycled females. After introduction of buck among the does, ovulation is detected around the third day of contact (Rekik et al., 2012; Delgadillo et al., 2017). However, in most cases this first ovulation is followed by a short luteal phase (5 – 7 days) which decreases the conception rate. A normal second ovulation accompanied by an oestrus behaviour occurs 7 to 9 days after buck introduction (Chemineau et al., 1984; Chemineau et al., 2006; Rekik et al., 2012). To avoid short ovarian cycles induced by male effect, goats should be primed with progestagens or natural progesterone before the introduction of buck; thereby improving the fertility of the first ovulation (Chemineau et al., 2006).

The aim of the present study was to assess in spring (seasonal anestrus) and autumn (reproduction season) the efficiency of a FGA – PGF2alpha treatment combined to a buck effect started 48 hours before or at FGA sponge removal on oestrus and ovulation in Beni Arouss goats.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and management

This study was conducted on the experimental station of INRA, Regional Center of Tangier, located in the North of Morocco (latitude 35°44'N, longitude 5°54' O) during the anoestrus season and the breeding season.

In both study parts, the goats were maintained in a semi-intensive system under natural photoperiod with access to pasture. Oat hay and concentrate feed mixture were distributed once a day according to the maintenance requirements (INRA, 1988) with water and mineral salt available *ad libitum*.

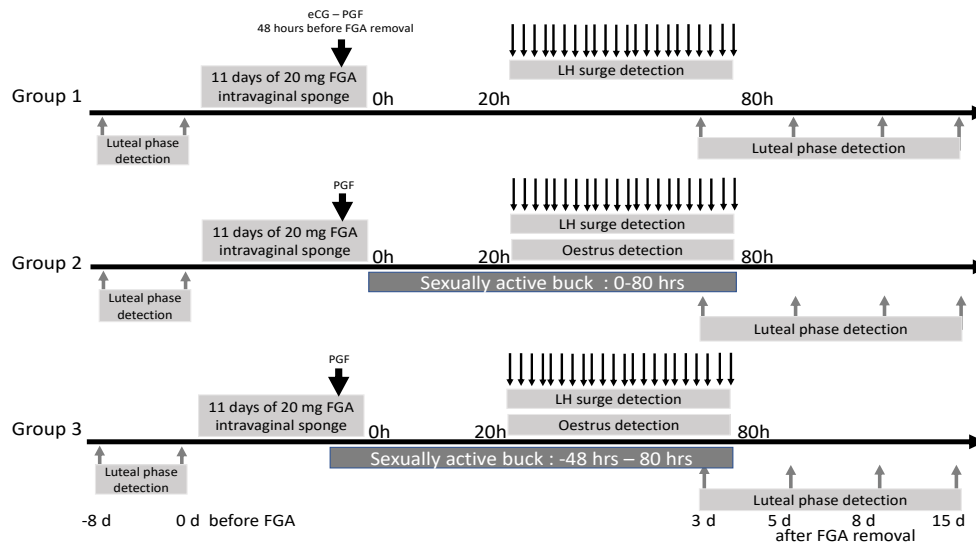
Females were strictly separated from males (non-present on site) for at least 1 month before the start of the study.

Four bucks were used to stimulate females in this study (2 bucks per group). They were maintained indoors in individual pens in another barn isolated from the females (20 Km of distance) and fed oat hay and concentrate feed mixture distributed according to the recommended requirements of INRA (1988) with water available *ad libitum*.

### 2.2. Experimental design and treatments

The first part of the study was conducted during April (anoestrus season), the second part was realized in November (reproduction period). Forty-three (anoestrus) and 45 (reproduction period) nonlactating Beni Arouss goats aged between 3 and 6 years and a live weight of  $29 \pm 4$  kg were used. All females had given birth at least once before entering the study and were randomly assigned to three treatment groups in function of age and body weight. At being of the protocol, absence (during anoestrus) or presence (during reproduction period) of a luteal phase was assessed by plasma progesterone assessment 8 and 0 days before vaginal sponge placement. A vaginal sponge delivering 20 mg of fluorogestone acetate (FGA; Chronogest, Intervet, France) was placed during 11 days and 50 µg of cloprostenol (Estrumate, MSD animal Health, Morocco) was administered intramuscularly 48 hours before sponge removal. In group 1, considered as control, 300 IU of eCG (Synchro-part, Ceva, Morocco) was also administrated intramuscularly 48 hours before sponge removal. In group 2, eCG injection was replaced 48 hours before sponge removal by sexually active, but aproned, bucks. In group 3, aproned bucks also replaced eCG injection and were introduced at sponge removal. In order to prevent buck effect in group 1, goats were kept in complete isolation (>100 m, indoors) from the groups 2 and 3. FGA and cloporostenol treatments in groups 2 and 3 were timed in order to allow a simultaneous introduction of the bucks who were maintained in the groups until 80 hours after sponge removal. Oestrus behaviour was recorded between 20 and 80 hours after sponge removal in groups 2 and 3 where bucks were present. In all groups, blood samplings performed at 2 hour intervals between 20 and 80 hours after sponge removal aimed at assessing the preovulatory LH surge. Further samples were taken 3, 5, 8 and 15 days after sponge removal and aimed at detecting a luteal phase by dosing progesterone. The experimental design is shown in Figure 1.





**Figure 1.** Experimental design

### 2.3. Application of photoperiodic treatment to bucks

The preparation of the bucks started before anoestrus season, on 14 November. They were submitted to a photoperiodic treatment of long days (16 h of light and 8 h of darkness per day) from 14 November to 28 January. This treatment was provided using the flash method in open barns and the intensity of the artificial light provided was at least 200 lux at the level of the eyes of the animals. Artificial light was regulated by an automatic clock and was provided from 06:00 to 09:00 h and from 22:00 to 24:00 h in order to obtain a total of 16 h of light per day. On 29 January, the light treatment was stopped, and the bucks were exposed to natural day length variations until the end of the study (24 April). This treatment has previously been shown efficient to stimulate the male reproductive activity during the non-breeding season (Veliz et al., 2006; Chentouf and Bister, 2011; Chasles et al., 2016; Delgadillo et al., 2017).

### 2.4. Luteal phase detection by plasma progesterone measurement

Blood samples were collected from all goats via the jugular vein using 9 ml heparinized vacutainer tubes. To establish the reproductive status of goats, blood samples were collected 8 days before sponge insertion, the day of sponge insertion and 3, 8, 11 and 15 days after sponge removal. Plasma was separated by centrifugation at 2200 rpm for 20 min, transferred into 1.5 ml microcentrifuge tubes and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the assay. Progesterone concentrations were measured in duplicate samples using a commercial ELISA kit (abia Progesterone DK.039.01.3, AB Diagnostic Systems GmbH, Germany). The detection limit of the assay was 0.1 ng/ml, and the intra- and interassay coefficients of variation were 3% and 8 %, respectively. Goats were considered to be in luteal phase when their plasma progesterone concentration was higher than 2 ng/ml at two successive blood samplings. They were considered to be in anoestrus if the samples performed at -8 and 0 days before FGA treatment revealed progesterone concentrations below 2 ng/ml.

### 2.5. Onset of oestrus

In group 2 and group 3, the oestrus behaviour was checked every hour from 20 to 80 h after sponge removal by the same bucks used in female's stimulation already fitted with a plastic apron and a marking crayon. The goats were considered to be in oestrus only if they stood while be mounted by the bucks and showed a crayon mark.

### 2.6. Preovulatory LH surge

Plasma LH concentration was measured every two hours from 20 to 80 h after sponge removal. The collected blood was treated as previously described. Concentrations of plasma LH were determined in duplicate samples using commercial ELISA kit (LH Detect for caprines, ReproPharmVet, INRA, France). The detection limit of the assay was 0.1 ng/ml, and the mean intra-assay and inter-assay coefficient of variation were respectively 3% and 11%. Preovulatory LH surge was determined as the time of the maximum LH concentration with at least, a fivefold amount of the basal LH concentration.

### 2.7. Statistical analysis

Based on plasma progesterone analysis performed on samples collected prior to hormonal treatment (-8 and 0 days before FGA treatment), goats displaying ovarian activity in spring (n=2) and goats displaying absence of ovarian activity in autumn (n=0) were excluded from the dataset. The number and proportion of animals within each season and each group displaying signs of oestrus, a preovulatory LH surge and onset of a luteal phase after 3 to 8 and after 11 to 15 days after FGA sponge removal was calculated. The interval between FGA sponge removal and onset of oestrus and LH surge was calculated for each animal and expressed as medians with their minimum and maximum in function of season and group.

The normal distribution of the data was assessed using the Shapiro-Wilk test. The Kruskal-Wallis and Wilcoxon sum rank tests were used to analyze non-parametric data with treatment (group) as main effect. Frequency data were assessed by the Fisher's exact test. The significance level was set at ( $P < 0.05$ ) in all tests. The R statistical software (version 3.5.1) was used for data analyses.

## 3. Results

No sponge losses were recorded during both parts of the study. During the anoestrus season in spring, most of the goats of groups 2 and 3 stimulated by the male effect showed a similar oestrus response rate (77 %) at an interval ranging from 60 to 77 hours following sponge removal (Table 1 and Figure 2A). Oestrus occurred significantly earlier in goats of group 3 (median: 68 hours; range 60 – 74 hours) than in goats of group 2 (median :74 hours; range 71 – 77 hours;  $P < 0.05$ ). In group 1, oestrus remained voluntarily non-detected. 77 % of goats displayed preovulatory LH surge at an interval ranging from 24 to 40 hours after sponge removal. However, none of the goats induced by the male effect showed a preovulatory LH surge (Table 1, Figure 2B). No luteal phase occurred within 3 to 8 days or 11 to 15 days after sponge removal in groups 2 and 3, whereas 67% of goats in group 1 developed an active corpus luteum.

**Table 1.** Treatment effect on oestrus induction, preovulatory LH surge and onset of luteal phase within 8 and 15 days post FGA removal. Data are shown as absolute numbers and proportions of responding goats.

Season	Group	FGA	PGF2alpha	eCG	Buck introduction	Oestrus detected	LH surge	Luteal phase after 3-8 days	Luteal phase after 11-15 days
Spring (n=43)	1 (n=13)			300 IU	-	NA	77%	67%	67%
	2 (n=15)	20 mg	50 µg	-	0 hrs	87%	0% *	0%	0%
	3 (n=15)			-	- 48 hrs	67%	0% *	0%	0%
Autumn (n=45)	1 (n=15)			300 IU	-	NA	73%	73%	93%
	2 (n=15)	20 mg	50 µg	-	0 hrs	100%	87%	67%	87%
	3 (n=15)			-	- 48 hrs	100%	93%	67%	93%

FGA, fluorogestone acetate; eCG, equine chorionic gonadotropin; PGF2alpha, prostaglandin F2alpha. NA: Oestrus was not assessed as no bucks were introduced in group 1. \*: No LH surge was detected between 20 and 80 hours after FGA sponge removal.

For the treatments based on male exposure during the sexual season in autumn, oestrus response rate in groups 2 and 3 was of 100 % and occurred between 22 and 68 hours after FGA sponge removal, which was significantly earlier than in spring (Table 1, Figure 2A). Animals of all 3 groups displayed a preovulatory LH surge (84 %) at an interval ranging from 30 to 70 hours following sponge removal (Figure 2B). The percentage of females displaying a luteal phase within 3 and 8 days from sponge removal did not differ among treatment groups ( $P > 0.05$ ), with an overall percentage of 69 % (Table 1). After 11 to 15 days, the occurrence of ovulation followed by a normal luteal phase was raised in all groups and reached 91 % without significant differences between groups ( $P > 0.05$ ).

Figure 2 A

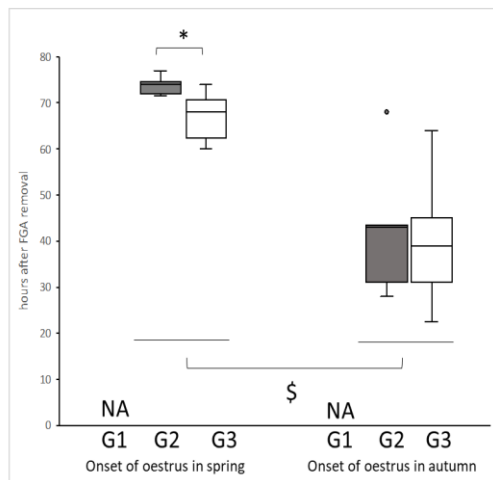
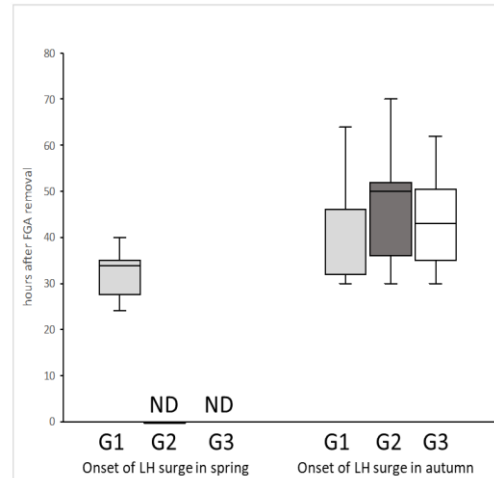


Figure 2 B



**Figure 2.** Onset of oestrus (A) in spring and autumn and time point of LH surge recorded in spring and autumn (B) in Beni Arouss goats' groups G1, G2 and G3. NA: Oestrus was not assessed in groups G1. ND: no LH surge was detected between 20 and 80 hours after FGA sponge removal in G2 and G3 investigated in spring. Results are expressed in hours (median with minim and maximum). \* indicates a significant group-related difference ( $P < 0.05$ ). \$ indicates a season-related difference ( $P < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

This study investigates for the first time the efficiency of the buck effect in Beni Arouss goats. If the so-called “classical treatment” based on FGA, eCG and cloprostenol was efficient in spring during anoestrus and in autumn during the reproduction period and confirms earlier studies (El Kadili et al., submitted), the introduction of a buck 48 before or at FGA sponge removal to replace eCG treatment failed to induce an appropriate ovarian response during anoestrus. In autumn however, both tested treatments were efficient.

Although the present study does allow to provide answers regarding the efficiency of the buck effect in Beni Arouss goats, several limitations should be pointed out. The animals investigated in group 1 were not exposed to a sexually active buck in order to compare the impact of eCG treatment with the buck effect. As a consequence, no data about onset of oestrus were available. It could have been interesting to use a fourth group receiving the “classical protocol” plus a buck effect. Another weakness was the delayed onset of oestrus in spring, which was unexpected: even it is unlikely that an appropriate LH surge occurred in animals of group 2 and 3 (no luteal phase occurred within 15 days), the time frame of blood collection should have been increased above 80 hours post sponge removal. It would furthermore have been interesting to assess plasma oestrogen levels in these goats: oestrus signs occurred, but lately, without leading to ovulation. Characterizing the follicular response would be helpful if further studies testing the buck effect are performed.

During both seasons, the response to the standard protocol did not differ with an overall preovulatory LH surge response of 75 % and a median interval to LH surge of 34 hours (range

24 to 64 hours) following sponge removal. In general, the response was relatively similar to what is reported in our previous study (El Kadili et al., submitted). In group 1 investigated in spring, one goat died suddenly for unknown reasons after the LH detection period (ie 80 hours after sponge removal). Moreover, another goat of group 1 displayed a preovulatory LH surge but did not ovulated nor within 15 days following sponge removal. This could be indicative of an inadequate release of LH because of a deficiency in GnRH synthesis and secretion resulting in failure of ovulation in females (Noakes et al., 2009). During the breeding season, three goats did not display a preovulatory LH within 80 hours after sponge removal but were recorded as having ovulated within 11 to 15 days after sponge removal, which indicates a late occurrence of LH surge.

Curiously, during the anoestrus season, goats induced by the buck effect showed only an oestrus response (77 %) but which occurred later at an interval of 60 to 77 hours after sponge removal. When compared to results obtained in goats treated with the standard protocol in our previous study (El Kadili et al., submitted), in which oestrus onset was monitored, a delay in oestrus onset was detected in groups stimulated by the buck effect. This could be attributed to the effect of progestagen priming. The role of progestagen is to increase the time for follicular maturation and delay the preovulatory LH surge in order to prevent the appearance of corpus luteum with short lifespan induced by the use of buck effect alone in anovulatory females (Chemineau, 1985; Lassoued et al., 1995; Chemineau et al., 2006). The absence of ovulation even after 15 days from sponge withdrawal let us presume that goats' responses started lately, with an LH surge occurring after the 80 hours of blood sampling, and that the LH surge was not followed by ovulation. This result could be related to the low concentration of progestogen added in the sponge, that can be associated with abnormalities in follicle development, ovulation and luteal function (Viñoles et al., 1999; 2001). Previous findings reported by Chentouf and Bister (2011) showed a preovulatory LH surge response of 86 % detected at an interval of 55 hours ( $\pm 13.5$ ) after buck introduction in goats from the same breed when stimulation is performed by photoperiod treated bucks and primed by a progestagen (45 mg of FGA) in April. Likewise, in our study bucks were already submitted to a photoperiodic treatment to improve the response of goats to the biostimulation. However, the goats were treated only with a dose of 20 mg FGA, low dose that may influence the efficacy of response. Furthermore, our results disagreed with those described in the studies of Pellicer-Rubio et al. (2007; 2008) where the photoperiodic treatment involved the bucks and goats, and the progestational treatment consisted on intravaginal sponges impregnated with 45 mg of FGA. An overall LH surge response of 94 % was obtained in the first study (in 2007) with an interval buck introduction to LH surge of 54.3 hours ( $\pm 15.4$ ). Indeed, more than 90 % of goats ovulated within 15 days after buck introduction. Relatively similar results were reported also in the second study (in 2008). Many factors could explain this variability of responses. As reported by several authors, photoperiodic treatment of bucks and goats allow highly synchronous and fertile reproductive activity when male effect is performed in the middle of seasonal anoestrus (Restall, 1992; Chemineau et al., 1996; Walkden-Brown et al., 1999; Flores et al., 2000; Delgadillo et al., 2002; Pellicer-Rubio et al., 2007). In addition, variations in female responsiveness, quality of stimulation provided by the male, prior isolation, nutritional status, exposition of bucks to oestrous females prior the joining, the age and experience of the males and age of the goats may influence the induction of an ovulatory response by the buck effect (Walkden-Brown et al., 1993; Perkins and Fitzgerald, 1994; Flores et al., 2000; Thimonier et al., 2000; Ungerfeld et al., 2007).

In the current study, two more findings are interesting to mention in relation to the use of buck effect during anoestrus. Firstly, the onset of oestrus occurred earlier when bucks were introduced 48 h prior to sponge removal (Figure 2A), which was in line with results obtained when the injection of eCG was performed 48h prior to sponge removal leading to an advanced follicular growth and consequent LH surge (Ritar et al., 1984). Secondly, as shown by goats of group 2, the introduction of bucks at sponge removal seems to synchronize more efficiently the onset of oestrus in comparison with buck introduction two days before sponge removal. All females showed their oestrus within a time frame of 6 hours, possibly as a consequence of well synchronized endogenous rhythm of FSH secretion.

During the sexual season, where the use of the “classical protocol” remained in line with a previous study (El Kadili et al., submitted), our results clearly indicate that the male effect protocol may be an adequate alternative for oestrus and ovulation induction and synchronization in Beni Arouss goats. The time of buck introduction did not influence oestrus response (100 %) or time to the onset of oestrus following sponge removal, with an interval ranging from 22 to 68 hours. In addition, animals in all groups responded to the treatments by displaying preovulatory LH surge and ovulation, without significant differences in the timing of the occurrence.

## **5. Conclusion**

This study showed that the use of a sexually active buck aiming to induce and to synchronize oestrus and ovulation in the Beni Arouss goats treated with 20 mg of FGA and cloprostenol during the anoestrus season is not efficient in comparison to a hormonal treatment based on administration of FGA, eCG and cloprostenol. However, the use of the buck effect in cyclic goats primed with progestagen treatment and intramuscularly injected with cloprostenol 48 h prior to sponge removal appears as a very promising alternative method for synchronization of oestrus and ovulation in Beni Arouss goats. The tested protocols need to be validated on a large number of animals and under field conditions.

## **Conflict of interest**

The authors confirm that there are no conflicts of interests.

## **Acknowledgments**

This research was supported by the Belgian Academy for Research and Higher Education-Development Cooperation Committee (ARES-CCD). It was conducted at INRA, Regional Center of Tangier. The authors thank staff of this center for their assistance with animal handling and care during this study.

## **References**

- Álvarez, R.L., Zarco, Q.L., 2001. Los fenómenos de biostimulación sexual en ovejas y cabras. *Vet. Méx.* 32, 117–129.
- Baril, G., Remy, B., Leboeuf, B., Beckers, J.F., Saumande, J., 1996. Synchronization of oestrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time occurrence of oestrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 45, 1553-1559.

- Chasles, M., Chesneau, D., Moussu, C., Delgadillo, J.A., Chemineau, P., Keller, M., 2016. Sexually active bucks are efficient to stimulate female ovulatory activity during the anestrus season also under temperate latitudes. *Anim. Reprod. Sci.* 168, 86-91.
- Chemineau, P., Poulin, N., Cognie, Y., 1984. Sécrétion de progestérone au cours du cycle induit par l'introduction du mâle chez la chèvre créole en anoestrus : effets de la saison. *Reprod. Nutr. Dev.* 24, 557-561.
- Chemineau, P., 1985. Effects of a progestagen on buckinduced short ovarian cycles in the Creole meat goat. *Anim. Reprod. Sci.* 9, 87-94.
- Chemineau, P., Malpaux, B., Pelletier, J., Leboeuf, B., Delgadillo, J.A., Deletang, F., Pobel, T., Brice, G., 1996. Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et caprins. *INRA Prod. Anim.* 9, 45-60.
- Chemineau, P., Pellicer-Rubio, M., Lassoued, N., Khaldi, G., Monniaux, D., 2006. Male-induced short oestrus and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod. Nutri. Deve.* 46, 417–429.
- Chentouf, M., Bister, J.L., 2011. Light treated bucks induce a well synchronized estrus and LH peak during anestrus season by male effect in North Moroccan goats, 62nd Annual Meeting of European Association of Animal Production, August 29th – September 2nd 2011, Stavanger, Norway.
- Delgadillo, J.A., Carrillo, E., Moran, J., Duarte, G., Chemineau, P., Malpaux, B., 2001. Induction of sexual activity of male creole goats in subtropical northern Mexico using long days and melatonin. *J Anim. Sci.* 79, 2245-2252.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Veliz, F.G., Hernandez, H.F., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P., Malpaux, B., 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *J Anim. Sci.* 80, 2780-2786.
- Delgadillo, J.A., Vélez, L.I., 2010. Stimulation of reproductive activity in anovulatory Alpine goats exposed to bucks treated only with artificially long days. *Animal* 4, 2012–2016.
- Delgadillo, J.A., Chemineau, P., Keller, M., 2017. Using Socio-Sexual Stimulations for Sustainable Goat Production Under Subtropical Latitudes, In: Simões J., G.C.e. (Ed.), *Sustainable Goat Production in Adverse Environments*. Volume I, Springer, Cham.
- FAO, 2007. Global plan of action for animal genetic resources and the Interlaken Declaration, Rome (available at [www.fao.org/docrep/010/a1404e/a1404e00.htm](http://www.fao.org/docrep/010/a1404e/a1404e00.htm)).
- Flores, J.A., Véliz, F.G., Pérez-Villanueva, J.A., Martínez de la Escalera, G., Chemineau, P., Poindron, P., Malpaux, B., Delgadillo, J., 2000. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biol. Reprod.* 62, 1409–1414.
- INRA, 1988. *Alimentation des bovins, ovins et caprins*, INRA, Paris.
- Lassoued, N., Khaldi, G., Cognié, Y., Chemineau, P., Thimonier, J., 1995. Effet de la progestérone sur le taux d'ovulation et la durée du cycle ovarien induits par effet mâle chez la brebis Barbarine et la chèvre locale tunisienne. *Reprod. Nutr. Dev.* 35, 415-426.
- Lopez-Sebastian, A., Gonzalez-Bulnes, A., Carrizosa, J.A., Urrutia, B., Diaz-Delfa, C., Santiago-Moreno, J., Gomez-Brunet, A., 2007. New estrus synchronization and artificial insemination protocol for goats based on male exposure, progesterone and cloprostenol during the non-breeding season. *Theriogenology* 68, 1081-1087.
- Luna-Orozco, J.R., Guillen-Muñoz, J.M., De Santiago-Miramontes, M.A., García, J.E., Rodríguez-Martínez, R., Meza-Herrera, C.A., Mellado, M., Véliz, F.G., 2012. Influence of sexually inactive bucks subjected to long photoperiod or testosterone on the induction of estrus in anovulatory goats. *Trop. Anim. Health. Prod.* 44, 71–75.
- Martin, G.B., Milton, J.T.B., Davidson, R.H., Banchemo Hunzicker, G.E., Lindsay, D.R., Blache, D., 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 231-246.

- Noakes, D.E., Parkinson, D.J. and England, G.C.W., Pregnancy and parturition. Arthurs veterinary reproduction and obstetrics, (Ed.) Noakes, D. E., Saunders Elsevier (2009).
- Pellicer-Rubio, M.T., Leboeuf, B., Bernelas, D., Forgerit, Y., Pougard, J.L., Bonne, J.L., Senty, E., Chemineau, P., 2007. Highly synchronous and fertile reproductive activity induced by the male effect during deep anoestrus in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. *Anim. Reprod. Sci.* 98, 241-258.
- Pellicer-Rubio, M.T., Leboeuf, B., Bernelas, D., Forgerit, Y., Pougard, J.L., Bonné, J.L., Senty, E., Breton, S., Brun, F., Chemineau, P., 2008. High fertility using artificial insemination during deep anoestrus after induction and synchronisation of ovulatory activity by the “male effect” in lactating goats subjected to treatment with artificial long days and progestagens. *Anim. Reprod. Sci.* 109, 172–188.
- Perkins, A., Fitzgerald, J.A., 1994. The behavioral component of the ram effect: the influence of ram sexual behavior on the induction of estrus in anovulatory ewes. *J Anim. Sci.* 72, 51-55.
- Rekik, M., Ben Salem, I., Lassoued, N., 2012. Reproductive efficiency for increased meat production in goats. In: Mahgoub O, K.I., Webb E (eds), (Ed.), *Goat Meat Production and Quality*. CABI International, Wallingford Oxfordshire, UK, pp. 119-160.
- Restall, B., 1992. Seasonal variation in reproductive activity in Australian goats. *Anim. Reprod. Sci.* 27, 305-318.
- Ritar, A.J., Maxwell, W.M.C., Salamon, S., 1984. Ovulation and LH secretion in the goat after intravaginal progestagen sponge PMSG treatment. *J. Reprod. Fert.* 72, 559-563.
- Roy, F., Maurel, M.C., Combes, B., Vaiman, D., Crihiu, E.P., Lantier, I., Pobel, T., Deletang, F., Combarnous, Y., Guillou, F., 1999. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. *Biol. Reprod.* 60, 805-813.
- Shelton, M., 1960. Influence of the Presence of a Male Goat on the Initiation of Estrous Cycling and Ovulation of Angora Does. *J Anim. Sci.* 12, 368-375.
- Thimonier, J., Cognie, Y., Lassoued, N., Khaldi, G., 2000. L’effet male chez les ovins: une technique actuelle de maîtrise de la reproduction. *INRA Prod. Anim.* 13, 223–231.
- Ungerfeld, R., Ramos, M.A., Gonzalez-Pensado, S.P. 2008. Ram effect: adult rams induce a greater reproductive response in anestrous ewes than yearling rams. *J Anim. Reprod. Sci.* 103, 271–277.
- Veliz, F.G., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2006. Maintaining contact with bucks does not induce refractoriness to the male effect in seasonally anestrous female goats. *J Anim. Reprod. Sci.* 92, 300-309.
- Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M., Rubianes, E., 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 51, 1351–1361.
- Viñoles, C., Forsberg, M., Banchero, G., Rubianes, E., 2001. Effect of long-term and short-term progestagen treatment of follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55, 993–1004.
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B., Henniawati, 1993. The male effect in the Australian cashmere goat. 3. Enhancement with buck nutrition and use of oestrous females. *Anim. Reprod. Sci.* 32, 69-84.
- Walkden-Brown, S.W., Martin, G.B., Restall, B.J., 1999. Role of male–female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52, 243–257.



## **Chapitre IV. Discussion générale, conclusions et perspectives**

## **Discussion générale**

### **Améliorer la productivité de la race Beni Arouss ? Oui, mais il faut tout d'abord maîtriser la reproduction chez cette race.**

Dans la région du Nord du Maroc, l'élevage caprin compte un cheptel important qui, malgré sa faible productivité, constitue la principale ressource de la population rurale notamment celle vivant dans les zones montagneuses. Suite à son mode de conduite extensif avec un accès libre aux espaces sylvopastoraux, la gestion de la reproduction chez les caprins locaux reste peu contrôlable.

La race Beni Arouss, considérée comme race locale de la région du Nord à l'instar des autres races locales au Maroc, est caractérisée par son adaptation au milieu dans lequel elle évolue ainsi que par un bon potentiel de production qui peut s'améliorer en passant d'une conduite extensive à une conduite intensive (Chentouf, 2007).

Comme nous l'avons déjà rapporté en introduction, dans sa politique régionale, le gouvernement marocain a pour objectif d'améliorer la production des élevages tout en conservant les ressources génétiques locales qui, malgré la grande variabilité qui existe dans leurs niveaux de production, restent une bonne base pour le développement de la filière. Pour ceci, la mise en place d'un programme d'amélioration génétique bien structuré s'avère indispensable.

Aujourd'hui, et à travers tous ses avantages, l'IA est largement utilisée pour intensifier la production dans le cadre des programmes d'amélioration génétique des races locales. Toutefois, son application nécessite de répondre à un certain nombre d'interrogations pour mettre au point les outils et les techniques de reproduction adaptées à la race et qui peuvent accompagner le projet de création d'un centre d'IA. La présente thèse avait comme objectifs de répondre à ces questions qui vont servir de base pour la maîtrise de la reproduction chez la chèvre Beni Arouss et par conséquent promouvoir la productivité des élevages.

### **La reproduction chez la chèvre Beni Arouss est-elle saisonnière ?**

La question a déjà une réponse : chez la chèvre Beni Arouss la reproduction a un caractère saisonnier très marqué, avec une période d'inactivité sexuelle qui va d'avril à juin (Chentouf et al., 2011). L'incidence d'œstrus et d'ovulation augmente progressivement à partir du solstice d'été pour atteindre son maximum durant l'automne et diminue progressivement après, à partir du solstice d'hiver.

La saisonnalité chez cette race est principalement contrôlée par la photopériode et est peu dépendante de l'alimentation, ce qui confirme le caractère rustique de cette chèvre et indique clairement le rôle majeur qu'exerce l'écart d'éclairement entre le solstice d'hiver et d'été (5 heures) sur la reproduction des chèvres au Nord du Maroc (Chentouf, 2007).

### **Chez les boucs Beni Arouss, l'activité sexuelle et la production de la semence varient-elles aussi en fonction de la saison ?**

Chez les boucs, le comportement sexuel, la taille testiculaire et la production de la semence et ses caractéristiques sont les principaux facteurs influencés par les fluctuations photopériodiques (Loubser et al., 1983 ; Branca et Cappai, 1989). Dans la région

méditerranéenne, la variation en aptitude de reproduction chez les boucs dépend de la photopériode et principalement la latitude (Zarazaga et al., 2009 ; Arrebola et al., 2010 ; Gallego-Calvo et al., 2015 ; Arrebola et Abecia, 2017). Toujours dans la même région, les boucs élevés sous des latitudes moyennes comprises entre 30 et 40 °N ont montré des variations saisonnières modérées avec une activité reproductrice plus prononcée en été et en automne. C'est le cas par exemple des races espagnoles comme Murciano granadina, Verata, Payoya et Blanche d'Andalousie (Roca et al., 1992 ; Perez et Mateas, 1996, Zarazaga et al., 2009 ; Arrebola et al., 2010 ; Gallego-Calvo et al., 2015 ; Arrebola et Abecia, 2017).

Comme montré dans notre première étude, le comportement sexuel, la taille testiculaire et les caractéristiques de la semence chez les boucs Beni Arouss élevés sous une latitude de 36 °N, sous conditions naturelles de photopériodes, sont également plus élevés pendant l'été et l'automne par rapport aux autres saisons. Notons qu'une variabilité entre les individus liée aux différences de poids et d'âge existe. Cette variabilité est due aux critères de choix des animaux, à savoir leur maturité sexuelle plutôt que leur poids et leur croissance. Dans le contexte d'un centre d'IA, le choix du mâle dépendra de la disponibilité en mâles et des critères d'amélioration visés par l'utilisation de tel ou tel reproducteur. D'ailleurs, Ahmad et Noakes (1996) et Delgadillo et al. (1991) ont rapporté que l'effet du poids et de l'âge sur les caractéristiques de la semence reste mineur par rapport à l'effet de la saison. Dans notre étude, un effet du poids et d'âge sur la taille testiculaire et la production spermatique a été décelé. Cependant, aucun effet sur la qualité de la semence n'a été enregistré.

D'après nos résultats, la taille testiculaire augmente en été et en automne et diminue de manière marquée en hiver. Les mêmes résultats ont été rapportés chez plusieurs races de la région méditerranéenne et du Moyen-Orient (Roca et al., 1992 ; Douk, 1996 ; Perez et Mateas, 1996 ; Babiker Abdelhai, 2003 ; Al-Ghalban et al., 2004 ; Zamiri et Heidari, 2006). Un nombre minimal de sauts par première éjaculation a été enregistré en été et début automne, ce qui montre l'importance de la libido durant cette saison qui coïncide avec le début de saison de reproduction chez la femelle. La concentration en spermatozoïdes des boucs Beni Arouss devient aussi élevée au printemps et en été, avec un maximum entre juin et août. Elle diminue ensuite pour atteindre un minimum en hiver. En effet, chez le mâle la stimulation de l'axe gonadotrope commence environ 2 mois avant le début de l'activité cyclique chez la chèvre en juillet, période durant laquelle les boucs doivent être déjà en pleine activité sexuelle et production spermatique. Cette différence dans la sensibilité à la photopériode est très importante, puisque les femelles en anœstrus ovulent en quelques jours après la stimulation, alors que les mâles ont besoin d'environ 52 jours pour terminer leur cycle spermatogénétique (Rosa et Bryant, 2003). Généralement, la qualité de la semence chez le Beni Arouss est meilleure en été et en automne par rapport aux autres saisons.

Chez les boucs, un parallélisme entre les niveaux endocriniens, les mensurations testiculaires et le comportement sexuel est observé, ce qui confirme que c'est bien le contrôle neuroendocrinologique qui influence la variation saisonnière de l'activité sexuelle (Chemineau et Delgadillo, 1994). En effet, l'un des principaux facteurs de variation du comportement sexuel chez le mâle est le taux de testostérone plasmatique, dont l'amplitude des pulses journaliers est soumise à des variations saisonnières. Dans notre recherche, des prélèvements sanguins mensuels ont été effectués afin de déterminer le profil de variation de la concentration de la testostérone en fonction de la saison. Malheureusement, les dosages n'ont pas été réalisés à cause du coût trop élevé des kits ELISA destinés au dosage de la testostérone caprine. Un kit

humain moins coûteux par rapport aux kits spécifiquement développés pour les caprins a été testé mais n'a pas pu être adapté de manière fiable à l'espèce caprine.

Afin d'évaluer l'effet de la saison sur la motilité des spermatozoïdes ainsi que sur la morphométrie de leurs têtes, le système CASA a été utilisé. En effet, tous les paramètres de motilité, et en particulier la motilité progressive et les vitesses, se sont avérés liés positivement à la migration des spermatozoïdes dans le mucus, la pénétration dans les ovocytes et la capacitation des spermatozoïdes. De ce fait, ces paramètres peuvent être de bons indicateurs pour prédire le pouvoir fécondant de la semence (Cox et al., 2006 ; Kathiravan et al., 2008 ; Del Olmo et al., 2013). Chez les boucs Beni Arouss, la plupart des paramètres de motilité étaient élevés en été et en automne et diminuaient ensuite pour atteindre un minimum en hiver. Bien que surtout dépendante de la cyclicité des chèvres, la concentration des chevrotages entre décembre et mars chez cette race reflète bien le pouvoir fécondant optimal de la semence des boucs en été et en automne.

La signification des changements des dimensions de la tête du spermatozoïde reste mal connue. Aucune corrélation avec la viabilité n'a été décelée, sauf qu'une augmentation dans les dimensions de têtes des spermatozoïdes a été enregistrée en automne et qui, suivant plusieurs études, peut être liée à la fertilité (Hildago et Dorado, 2009 ; Bravo et al., 2014 ; Martinez-Rodriguez et al., 2015 ; Waheed et al., 2015). En effet, dans notre étude l'augmentation de la taille de la tête en automne peut être due à une altération dans le phénomène de condensation de la chromatine au niveau de la tête durant la saison estivale. Ce phénomène qui intervient normalement chez le male lors de la spermiogénèse, permet à travers la réduction du volume nucléaire de protéger le génome paternel, ainsi que transporter facilement les spermatozoïdes lors de leur montée dans les voies génitales de la femelle avec des besoins plus faibles en énergie. Selon Rahman et al. (2011 ; 2018), le stress thermique qui peut survenir en saison estivale même s'il n'est que de 48h peut avoir un impact sur la conformation de la chromatine et ainsi influencer la morphologie de la tête et par conséquent la fertilité. Les résultats de notre étude laissent supposer qu'un stress a été exercé en été et dont l'effet sur la morphologie de la tête est apparu plus tard suivant le stade spermatogénique dans lequel l'animal a été lors de l'exposition au stress.

Finalement, le score établi à partir de l'ensemble des paramètres étudiés résume ce qui précède et confirme qu'une bonne aptitude de reproduction chez les boucs Beni Arouss est obtenue lorsque la durée d'éclairement commence à diminuer. Ceci survient juste avant le début de la saison de reproduction chez la chèvre. Toutefois il s'avère que l'amplitude de variation diffère d'un bouc à un autre, ce qui laisse suggérer qu'une sélection individuelle est à envisager notamment dans le cas où les animaux seront utilisés dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique et pour des récoltes de la semence pendant toute l'année.

#### **Y-a-t-il également un effet de la saison sur la qualité de la semence conservée à l'état liquide chez la race Beni Arouss ?**

Durant ces dernières années, la conservation de la semence à l'état liquide est devenue une technique courante et peu coûteuse pour développer l'insémination artificielle à grande échelle chez les chèvres (Leboeuf et al., 2000 ; 2003). Cependant, la capacité du sperme à maintenir sa qualité après conservation est essentielle pour offrir une plus grande flexibilité entre son utilisation dans les élevages et sa récolte au centre d'IA. De même, une étude préalable de

l'effet de la saison sur l'aptitude de conservation à l'état liquide de la semence est essentielle afin d'évaluer la capacité fécondante de la semence collectée et conservée dans différentes périodes de l'année.

D'après les résultats de la première étude, un effet de la saison sur l'activité sexuelle et les caractéristiques de la semence fraîche chez les boucs Beni Arouss a été mis en évidence. La conservation de cette semence à 16°C et pendant 24 heures dans un dilueur synthétique est influencée par ce contrôle photopériodique. En effet, et comme montré dans notre deuxième étude, la qualité de la semence a diminué progressivement entre 0 et 24 heures de conservation. Cette réduction est attendue puisque le refroidissement, en association avec le dilueur utilisé, le taux de dilution et les conditions de conservation (O'Hara et al., 2010), peuvent provoquer des altérations structurelles et fonctionnelles chez les spermatozoïdes influençant par conséquent la qualité spermatique. Par ailleurs, l'aptitude de conservation du sperme à 16°C et pendant 24h a été meilleure en été alors qu'une baisse prononcée a été enregistrée dans les autres saisons. Un résultat inattendu qui montre que, quoique l'automne fasse partie de la période de reproduction chez cette race, la conservation de la semence au cours de cette saison reste limitée en comparaison avec l'été.

La variation saisonnière de l'aptitude de congélation de la semence chez le bélier et le bouc, en parallèle avec les changements observés dans la composition du plasma séminal et lors de la dilution dans un dilueur donné, a été rapportée chez plusieurs races (Tuli et Holtz, 1995, D'Alessandro et Martemucci 2003, 2005 ; Gallego-Calvo et al., 2015). En effet, les protéines de la famille BSP (Binder of SPerm) détectées dans le plasma séminal chez plusieurs espèces (Bergeron et al., 2005 ; Villemure et al., 2003 ; Menard et al., 2003 ; Sanz et al., 1993) peuvent, selon des recherches réalisées chez le bélier, protéger les membranes des spermatozoïdes lors d'un choc thermique (Perez-Pe et al., 2001 ; Barrios et al., 2005). Ceci montre le rôle majeur de ces protéines dans la stabilisation de la membrane plasmique du spermatozoïde. Chez le bouc Beni Arouss, une augmentation de la concentration en protéines du plasma séminal avec le début d'été pourrait être responsable de la protection des spermatozoïdes durant la saison de reproduction, surtout qu'un dilueur dépourvu de lipides a été utilisé pour prévenir l'effet délétère des phospholipases sans faire recours au lavage. Il reste à ce stade incompris pourquoi ce rôle n'a pas été maintenu en automne. En plus, il s'avère que les enzymes antioxydantes sont aussi impliquées dans la prévention des chocs thermiques (Marti et al., 2007) en plus de leur rôle dans le métabolisme et la fonction spermatique (Brooks, 1990). Chez les chèvres, aucune étude n'a été menée pour étudier l'effet de la saison sur les enzymes antioxydantes et l'association de ces enzymes aux traits séminaux du sperme frais et refroidi. Seulement, il se peut que la réduction observée dans l'aptitude de conservation en automne soit liée à une activité métabolique maximale engendrant par conséquent une sollicitation excessive d'enzymes antioxydantes. Par ailleurs, il s'avère que les périodes de chaleurs estivales, même si elles sont de courte durée, peuvent dans certains cas influencer la qualité de la semence chez le male (Rahman et al., 2011). En effet, l'impact du stress thermique sur la qualité du sperme chez le bovin n'apparaît que quelques jours après. Suivant la durée du cycle spermatogénique chez le male, le stress thermique peut entraîner une période prolongée (d'un mois ou plus) de qualité réduite du sperme (Rahman et al., 2011). Chez le bouc, la spermatogenèse dure environ 52 jours, ce qui laisse supposer qu'un effet négatif tardif d'un stress thermique survenu pendant l'été sur l'aptitude de conservation de la semence a été marqué en automne. D'avantage, il se peut que l'augmentation de la température ait un effet négatif sur l'aptitude de conservation du

sperme, qui pourrait être liée à une augmentation dans la production des DRO. Si l'équilibre de ces derniers dans le plasma séminal n'est pas gardé, la qualité du sperme conservé sera réduite (Rahman et al., 2018).

Finalement, il reste à évaluer après IA chez des chèvres en chaleurs, la capacité fertilisante du sperme après conservation pendant 24h à 16°C. D'un point de vue qualité de la semence après 24h, nos résultats étaient similaires à ceux trouvés par Ohara et son équipe (2010) lorsqu'ils ont conservé à 5°C et pendant 24h la semence chez le bélier. Ces derniers ont rapporté des taux de gestation respectivement de 63% et 54% après avoir inséminé par voie cervicale un groupe de brebis avec du sperme frais et un autre avec du sperme conservé pendant 24h. Ceci laisse espérer que chez les boucs Beni Arouss, et indépendamment de la saison, la semence puisse également garder un pouvoir fécondant satisfaisant même après 24 h de conservation.

### **Quel protocole hormonal pour induire et synchroniser l'ovulation chez la chèvre Beni Arouss ?**

Chez les chèvres les traitements hormonaux sont utilisés afin de maîtriser les périodes de mise bas pour assurer une offre continue en lait tout au long de l'année ou pour synchroniser les ovulations dans l'élevage pour permettre de réaliser des IA simultanées sur un nombre important de femelles.

D'après les résultats de la troisième étude menée chez des chèvres Beni Arouss et dans laquelle plusieurs protocoles d'utilisation de doses différentes de FGA et d'eCG et de cloprostenol ont été testés, l'ensemble des protocoles ont été efficaces en anœstrus et en saison sexuelle pour induire et synchroniser l'œstrus et l'ovulation chez cette race.

Aucune différence entre les huit protocoles n'a été enregistrée sauf que l'utilisation en saison sexuelle des éponges imprégnées avec 40 mg de FGA retarde la venue en chaleurs et l'ovulation chez les chèvres. Cela laisse supposer que l'utilisation d'une dose élevée de progestagène entraîne chez la chèvre Beni Arouss, après retrait de l'éponge, un retard dans la suppression du rétrocontrôle négatif exercé par la progestérone engendrant par conséquent une latence hormonale responsable du retard observé dans la réponse au traitement.

Dans le contexte d'une réduction des doses hormonales, le protocole basé sur l'insertion d'une éponge imprégnée de 20 mg de FGA pendant 11j, avec des injections intramusculaires de 300 UI d'eCG et 50 µg de cloprostenol 48 h avant le retrait d'éponge est suffisant pour induire et synchroniser l'ovulation chez la chèvre Beni Arouss. En contre saison, l'administration de cloprostenol pourrait être évitée étant donné que très peu de chèvres sont cyclées (~10%) et que la durée d'exposition à la FGA est dans la plupart des cas suffisamment longue pour couvrir ou coïncider avec une lutéolyse spontanée. La progestéronémie élevée due à la présence d'un corps jaune encore fonctionnel après l'arrêt du traitement progestatif fait que les venues en œstrus et ovulations peuvent être retardées, voire bloquées après si on n'administre pas de cloprostenol (Corteel et Leboeuf, 1990 ; Leboeuf et al., 1998).

Des recherches à l'échelle des fermes et avec un effectif important doivent être conduites afin de vérifier les résultats et évaluer la fertilité après IA. En effet, dans notre étude, toutes les expériences ont été conduites au niveau d'une station expérimentale dans laquelle les conditions sont standardisées. En plus, un nombre réduit d'animaux a été utilisé ce qui a

certainement influencé l'homogénéité des groupes surtout après avoir retiré des animaux de l'expérience.

**Est-ce que l'utilisation de l'effet bouc pour induire et synchroniser l'ovulation chez des chèvres traitées avec des progestagènes est efficace ?**

Afin de promouvoir l'effet bouc en contre saison, les boucs doivent être sexuellement actifs (Veliz et al., 2002 ; Delgadillo et al., 2006 ; Delgadillo et al., 2015), notamment pour garder un pouvoir de stimulation assez élevé et par conséquent avoir une bonne qualité de stimulation (Veliz et al., 2006).

D'après les résultats de notre première étude, l'activité sexuelle des boucs Beni Arouss diminue en dehors de la période de reproduction. Bien que le nombre de sauts fût le seul paramètre qui ait changé suivant la saison de l'année, ce paramètre à lui seul ne permet pas d'évaluer le comportement sexuel chez le bouc, surtout qu'une chèvre en chaleur a été utilisée pour chaque récolte de la semence. En anœstrus saisonnier, les conditions sont différentes de sorte que quasi toutes les chèvres sont acycliques.

De ce fait, un traitement photopériodique des mâles a été réalisé afin de stimuler leur activité sexuelle avant leur utilisation visant à induire et à synchroniser l'ovulation chez les chèvres Beni Arouss en contre saison.

En effet, dans notre quatrième étude, une comparaison entre le traitement « classique » le plus efficient identifié dans la 3<sup>e</sup> étude (20mg FGA, 300UI d'eCG et 50 µg de cloprostenol) et le remplacement de l'eCG dans ce traitement par l'effet de boucs sexuellement actifs a été réalisé. Deux moments d'introduction de boucs ont été testés, 48 h avant ou au moment du retrait de l'éponge.

D'après les résultats, en contre saison, la réponse œstrale à l'effet bouc a été tardive par rapport au traitement classique. Le traitement progestatif auquel les chèvres ont été soumises avant leur stimulation par l'effet bouc visait à élargir le temps consacré à la maturation folliculaire et de retarder le moment du pic préovulatoire de LH de façon à prévenir l'incidence des cycles courts chez les femelles anovulatoires (Lassoued et al., 1995 ; Chemineau et al., 2006). Cependant, l'absence de corps jaune chez nos chèvres, même après 15 j post retrait d'éponge, permet de supposer que les chèvres n'ont pas ovulé, qu'un pic de LH est survenu en dehors de la période des prélèvements (80h) et qui n'a pas abouti à une ovulation ou bien la chèvre a ovulé et qu'elle a eu un cycle court. Il aurait été intéressant de réaliser un suivi des œstrogènes sanguins afin de mieux caractériser la réponse ovarienne en réponse à l'effet bouc. Les échographies ovariennes présentent également un intérêt à cet égard. D'après notre expérience, chez la chèvre, l'observation des ovaires par échographie reste compliquée à réaliser à cause de la petite taille des animaux. Les follicules et les corps jaunes ne sont pas facilement identifiables, une expertise est exigée pour détecter le moment de disparition de follicules préovulatoires qui indiquent que l'ovulation a eu lieu.

Dans notre étude, une faible dose de progestagène a été utilisée (20 mg). L'utilisation d'une dose plus élevée (45 mg) n'a pas influencé le délai de pic de LH ni l'ovulation chez d'autres races (Pellicer-Rubio et al., 2007, 2008 ; Chentouf et Bister, 2011) et, par conséquent, n'a pas engendré des perturbations au niveau de la phase lutéale (Vinoles et al., 1999 ; 2001).

D'autres facteurs peuvent influencer la réponse à l'effet bouc, à savoir la réactivité de la femelle, l'âge et l'expérience des mâles, la nutrition, la stimulation des boucs avec des femelles en œstrus avant leur utilisation et la qualité de la stimulation (Walkden-Brown et al., 1993; Perkins and Fitzgerald, 1994; Flores et al., 2000; Thimonier et al., 2000; Ungerfeld et al., 2008).

Au cours de notre étude, les mâles n'ont pas été stimulés par des femelles mises en œstrus avant leur introduction dans les lots. En plus, ils n'ont pas été évalués pour leur qualité de stimulation.

En effet, plusieurs études rapportent que pour évaluer la qualité et l'intensité de stimulation du bouc, un suivi du comportement sexuel en évaluant la variation en fonction de la saison de reproduction mais aussi après traitement photopériodique des principaux caractères liés au comportement et qui sont utilisés lors de la stimulation de la femelle à savoir les approches, le flehmen, la miction, les reniflements ano-génitaux et les sauts (Ponce et al., 2014; Loya Carrera et al., 2014; Bedos et al., 2016). Les mâles doivent avoir un comportement similaire à celui qu'ils ont en saison sexuelle.

En saison sexuelle, le remplacement de l'eCG par l'effet de bouc introduit 48h avant ou au moment du retrait d'éponge dans le protocole classique peut être une bonne alternative à ce dernier pour synchroniser l'œstrus et l'ovulation chez les chèvres Beni Arouss ; Il reste à vérifier la réponse des chèvres à un traitement dans lequel ni l'effet bouc ni l'eCG sont utilisés. En fait, il se peut que l'effet bouc ne soit pas utile pour la synchronisation des chèvres Beni Arouss en saison sexuelle et que seulement le traitement à base de progestagènes et cloprostenol suffira. Dans notre étude, un délai de LH qui varie entre 30 et 54 h après retrait d'éponge a été enregistré dans les 2 lots traités avec l'effet bouc ; 2 chèvres uniquement ont eu leurs pics de LH après les 54h. En prenant en considération le moment d'ovulation, les chèvres Beni Arouss stimulées avec l'effet bouc peuvent être inséminées 58h après le retrait d'éponge en saison sexuelle. En effet, dans notre essai et en se basant sur les résultats des études précédentes, les chèvres traitées avec l'effet bouc ont été inséminées 52h et 75h après le retrait d'éponge et les chèvres soumises au traitement classique ont été inséminées 48h après le retrait d'éponge. D'après les résultats obtenus et qu'on n'a pas présentés dans cette thèse, en anœstrus saisonnier aucune des chèvres n'a été gestante alors qu'en saison sexuelle, le taux de gestation a été satisfaisant dans les trois groupes (67%). Cette mauvaise fertilité inexpiquée peut être liée à plusieurs facteurs à savoir l'état de stress crée lors des prélèvements sanguins avant et après insémination artificielle, la qualité du corps jaune formé et l'état sanitaire des animaux.

Encore, des études à l'échelle des fermes, dans les conditions réelles et avec un effectif important doivent être conduites afin d'évaluer la qualité et la quantité d'ovulations qui par conséquent influencent la fertilité et la prolificité de la chèvre Beni Arouss.



## **Conclusions et perspectives**

Cette thèse avait pour objectifs de caractériser, en fonction de la saison, l'activité de reproduction et l'aptitude à la conservation à l'état liquide de la semence chez les boucs de la race Beni Arouss et de mettre au point des protocoles pour la maîtrise de la reproduction chez la chèvre de cette race. L'activité de reproduction et l'aptitude de conservation de la semence ont été étudiées mensuellement au cours des quatre saisons de l'année. Le volet consacré à la mise au point des protocoles d'induction et de synchronisation d'œstrus et d'ovulation chez la chèvre Beni Arouss a concerné au départ les protocoles hormonaux classiques avant de passer à la mise au point d'un protocole alternatif basé sur l'utilisation de l'effet bouc pendant l'œstrus et en saison sexuelle. Les résultats obtenus vont permettre de générer un guide à suivre lors de la mise en place du centre d'insémination artificielle qui va accompagner le programme d'amélioration génétique de cette race. Ce programme va contribuer au développement de la filière caprine, retenue par les autorités en tant que filière stratégique pour le développement de l'agriculture dans la région du Nord du Maroc.

La caractérisation en fonction de la saison du comportement sexuel, de la taille testiculaire et des caractéristiques de la semence chez les boucs Beni Arouss suggère que, malgré qu'une performance de reproduction maximale ait été obtenue en été et automne, à l'échelle des élevages, la reproduction peut être possible tout au long de l'année. De même, l'IA avec de la semence fraîche de telles caractéristiques reste prometteuse.

L'insémination artificielle avec de la semence conservée à l'état liquide est une technique pratique et très courante au niveau des centres d'IA. Seulement, dans la région du Nord du Maroc les élevages caprins sont éloignés les uns des autres et localisés dans des zones à accès difficile, la capacité du sperme à maintenir sa qualité pendant 24 heures de conservation est essentielle pour assurer une flexibilité suffisante entre le centre d'IA les élevages caprins de la région.

Lors de la conservation de la semence des boucs Beni Arouss dans un dilueur synthétique à 16°C et pendant 24 heures, la qualité de la semence a diminué progressivement entre 0 et 24 heures de conservation et cela est dans toutes les saisons de l'année. Cependant, après 24 heures de conservation, le sperme collecté en été était de meilleure qualité que celui collecté pendant les autres saisons à savoir l'automne. Afin de mieux comprendre la cause de cette faible aptitude de conservation à l'état liquide constatée en automne, une analyse de la composition du plasma séminal du bouc dans les différentes saisons de l'année doit être réalisée. La teneur en principales enzymes antioxydantes et le profil protéique sont parmi les composants qui nécessitent une évaluation afin d'essayer de mieux comprendre les mécanismes physiologiques impliqués dans cette variation entre la conservation du sperme en été et en automne.

Du point de vue de la qualité de la semence après 24h de conservation, nos résultats, lorsqu'on les compare avec ceux de la littérature, suggèrent que la semence du bouc Beni Arouss peut garder un pouvoir fécondant satisfaisant indépendamment de la saison, et ce même après 24h de conservation à l'état liquide. Pourtant, il serait intéressant d'évaluer après IA chez des chèvres en chaleurs et dans les différentes saisons de l'année la fertilité du sperme après conservation pendant 24 h.

Par ailleurs, sur le plan génétique, la congélation de la semence présente un atout supplémentaire. Des protocoles de congélation du sperme du bouc Beni Arouss doivent être

mis au point tant au niveau de la programmation du refroidissement qu'au de point de vue des cryoprotecteurs.

Chez la chèvre Beni Arouss, l'ensemble des traitements classiques appliqués ont été efficaces pour la stimulation et la synchronisation des chaleurs et des ovulations en période d'anœstrus saisonnier et en saison sexuelle. En saison sexuelle, l'utilisation des éponges imprégnées de 40 mg de FGA retarde les réponses œstrales et ovulatoires par rapport aux éponges de 20 mg de FGA.

Pour une moindre utilisation d'hormones, le protocole basé sur l'insertion d'une éponge imprégnée de 20 mg de FGA pendant 11j, avec des injections intramusculaires de 300 UI d'eCG et 50 µg de cloprostenol 48 h avant le retrait d'éponge est suffisant pour induire et synchroniser l'ovulation chez la chèvre Beni Arouss. Ce protocole doit être vérifié et validé en utilisant un nombre important d'animaux, idéalement avec une détermination du moment précis de l'ovulation et du taux d'ovulation à travers l'observation des ovaires par échographie.

D'après les résultats obtenus et en prenant en considération le moment estimé pour l'ovulation après le pic préovulatoire de LH, les chèvres soumises à ce traitement pourraient être inséminées 48h après le retrait d'éponge en anœstrus saisonnier et 42h après le retrait d'éponge en saison sexuelle. Des études supplémentaires doivent être conduites afin d'évaluer la fertilité après IA. La qualité et le taux d'ovulation restent parmi les principaux facteurs qui influencent la fertilité et la prolificité chez la chèvre.

Avec les utilisations répétées des traitements hormonaux à base d'eCG, une apparition des anticorps anti-eCG est décrite. En plus, l'évolution récente des préoccupations sociétales vers le renforcement du respect et du bien-être de l'animal d'une part et de la sécurité alimentaire des produits animaux à travers une réduction des résidus en hormones d'autre part obligera les éleveurs à favoriser des protocoles alternatifs au traitements hormonaux classiques. Chez la chèvre Beni Arouss, le remplacement dans le protocole classique mis au point dans notre recherche, de l'eCG par l'effet bouc en contre saison a généré de faibles résultats. Il sera cependant important de poursuivre des pistes alternatives où la posologie et la durée ou la voie d'administration de progestérone ou encore la durée de l'effet bouc devront être testées.

En saison sexuelle, le même protocole apparaît comme une alternative adéquate pour la synchronisation d'œstrus et d'ovulation chez la chèvre Beni Arouss. Toujours en prenant en considération le moment estimé d'ovulation, les chèvres semblent pouvoir être inséminées 58h après le retrait d'éponge en saison sexuelle. Des études de terrain doivent être conduites afin d'évaluer la fertilité après IA.

De point de vue pratique, au Nord du Maroc la plupart des élevages caprins sont conduits de manière extensive. De ce fait, la séparation entre les mâles et les femelles reste difficile à mettre en œuvre. Les éleveurs ne pouvant pas alimenter leurs males séparément, ils les laissent pâturer avec le reste du troupeau. Des solutions comme la création de coopératives ou de centres qui s'occupent de l'élevage collectif des boucs des éleveurs ainsi que de leur traitement photopériodique pour une utilisation efficace dans les élevages pendant la période idéale sont à envisager. Ces pratiques ont déjà commencé à être appliqués en Mexique et sont à considérer dans les futures stratégies de développement de la filière.

En guise de conclusion finale, il sera indispensable de tester auprès des élevages les acquis de cette recherche. Après vérification et éventuelle adaptation, ils pourront contribuer à une meilleure maîtrise de la reproduction chez la race Beni Arouss et au développement de l'insémination artificielle en vue de l'amélioration génétique de cette ressource locale.

## ***Références bibliographiques***

## Références bibliographiques

- Abecia, J.A., Forcada, F., Gonzalez-Bulnes, A., 2011. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 27, 67-79.
- Abecia, J.A., Forcada, F., Gonzalez-Bulnes, A., 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130, 173-179.
- Aboagla, E.M., Terada, T., 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* 69, 1245-1250.
- Adibmoradi, M., Najafi, M.H., Zeinoaldini, S., Ganjkanl, M., Yousefi, A.R., 2012. Effect of Dietary Soybean Oil and Fish Oil Supplementation on Blood Metabolites and Testis Development of Malegrowing kids. *Egypt. J. Sheep & Goat Sci.* 7, 19-25.
- Ahmad, N., Noakes, D.E., 1996. Seasonal variations in the semen quality of young british goats. *Br. Vet. J.* 152, 225-236.
- Aitken, R.J., Baker, M.A., De Iuliis, G.N., Nixon, B. 2010. New insights into sperm physiology and pathology. *Handb. Exp. Pharmacol.* 198, 99-115.
- Alami, N., Ben Bati, M., Boukharta, R., Jout, J., Zahrou, A. 2005. Quelle stratégie de recherche-développement pour l'élevage caprin dans la Province de Chefchaouen – Maroc ? ICRA-INRA-DPA Chefchaouen – Chambre d'Agriculture de Chefchaouen - Conseil régional de Tanger-Tétouan. Série de documents de travail N° 127. 74 p.
- Al-Ghalban, A.M., Tabbaa, M.J., Kridli, R.T., 2004. Factors affecting semen characteristics and scrotal circumference in Damascus bucks. *Small Rumin. Res.* 53, 141-149.
- Alvarez, L., Nava, R.A., Ramirez, A., Ramirez, E., Gutiérrez, J., 2009. Physiological and behavioural alterations in disbudded goat kids with and without local anaesthesia. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 117, 190-196.
- Álvarez, M., Tamayo-Canul, J., Martínez-Rodríguez, C., López-Urueña, E., Gomes-Alves, S., Anel, L., Martínez-Pastor, F., De Paz, P. 2012. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). *Anim. Reprod. Sci.* 132, 145-154.
- Amiridis, G.S., Cseh, S., 2012. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130, 152-161.
- Ángel-García, O., Meza-Herrera, C.A., Guillen-Muñoz, J.M., CarrilloCastellanos, E., Luna-Orozco, J.R., Mellado, M., Véliz-Deras, F.G., 2015. Seminal characteristics, libido and serum testosterone concentrations in mixed-breed goat bucks receiving testosterone during the nonbreeding period. *J. Appl. Anim. Res.* 43, 457-461.
- Araki, K., Arai, K.Y., Watanabe, G., Taya, K., 2000. Involvement of inhibin in the regulation of follicle-stimulating hormone secretion in the young adult male Shiba goat. *J. Androl.* 21, 558-565.
- Arrebola, F.M., Pérez-Marín, C.C., Santiago-Moreno, J., 2010. Limitation of seasonality in reproductive parameters of Mediterranean bucks, using photoperiod treatment. *Small Rumin. Res.* 89, 31-35.
- Arrebola, F.M., Abecia, J.-A., 2017. Effects of season and artificial photoperiod on semen and seminal plasma characteristics in bucks of two goat breeds maintained in a semen collection center. *Vet. World* 10, 521-525.
- Azerêdo, G.A., Esper, C.R., Resende, K.T., 2001. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Rumin. Res.* 41, 257-263.
- Babiker Abdelhai, E.A., 2003. Effect of Season on Sexual Behaviour, Semen Quality and Fertility of Nubian, Saanen and Crossbred Bucks in Sudan. Ph.D. Thesis. Department of Reproduction and Obstetrics University of Khartoum.
- Bailey, J.L., Morrier, A., Cormier, N. 2003. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Can. J. Anim. Sci.* 83, 393-401.
- Bakhach, J., Casoli, V., Guimberteau, J.C. 2007. La cryopréservation de tissus composites: principe, revue de la littérature et expérience de l'équipe bordelaise. *Ann. Chir. Plas. Est.* 52, 531-547.

- Baril, G., Remy, B., Vallet, J.C., Beckers, J.F., 1992. Effect of Repeated Use of Progestagen-PMSG Treatment for Estrus Control in Dairy Goats out of Breeding Season. *Reprod. Domest. Anim.* 27, 161-168.
- Baril, G., Leboeuf, B., Saumande, J., 1993. Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 40, 621-628.
- Barrios, B., Fernández-Juan, M., Muño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J., 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J. Androl.* 26, 40-47.
- Barkawi, A.H., Elsayed, E.H., Ashour, G., Shehata, E., 2006. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Rumin. Res.* 66, 209-213.
- Bedos, M., Flores, J.A., Fitz-Rodriguez, G., Keller, M., Malpoux, B., Poindron, P., Delgadillo, J.A., 2010. Four hours of daily contact with sexually active males is sufficient to induce fertile ovulation in anestrus goats. *Horm. Behav.* 58, 473-477.
- Bedos, M., Munoz, A.L., Orihuela, A., Delgadillo, J.A. 2016. The sexual behavior of male goats exposed to long days is as intense as during their breeding season. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 184, 35-40.
- Benlekhal A., Tazi S. L'Elevage caprin au Maroc : Etat des lieux et stratégie de développement. Dans Elevage caprin : de la modernité à la valorisation. Dans l'élevage caprin : de la tradition à la valorisation, 1re foire caprine d'Essaouira. Le 4 juin, Essaouira, Maroc ; 2005, p. 22-24.
- Benmoula, A., Badi, A., El Fadili, M., El Khalil, K., Allai, L., El Hilali, A., El Amiri, B., 2017. Effect of season on scrotal circumference, semen characteristics, seminal plasma composition and spermatozoa motility during liquid storage in INRA180 rams. *Anim. Reprod. Sci.* 180, 17-22.
- Bergeron, A., Villemure, M., Lazure, C. and Manjunath, P., 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 461-470.
- Bergeron, A., Manjunath, P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 73, 1338-1344.
- Bergeron, A., Brindle, Y., Blondin, P., Manjunath, P. 2007. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.* 77, 120-126.
- Berlinguer, F., Madeddu, M., Pasciu, V., Succu, S., Spezzigu, A., Satta, V., Mereu, P., Leoni, G.G., Naitana, S. 2009. Semen molecular and cellular features: these parameters can reliably predict subsequent ART outcome in a goat model. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, p. 125.
- Blache, D., Maloneyb, S.K., Revell, D.K., 2008. Use and limitations of alternative feed resources to sustain and improve reproductive performance in sheep and goats. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 147, 140-157.
- Bodin, L., Dion, S., Malpoux, B., Bouvier, F., Caillat, H., Baril, G., Leboeuf, B., Manfredi, E., 2007. Sexual seasonality of Alpine and Creole goats and maintained without reproduction. 58th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Dublin, Ireland
- Boué, P., Corteel, J.M., 1992. Aptitude of male goat sperm to withstand freezing: combined effects of season and time of sexual rest between two successive semen collections. In: Lokeshar R.R (Ed.), Recent Advances in Goat Productions. Proc. 5th Intl Conf. on Goats, New-Delhi.
- Boué, P., Sigwald, J.P., 2001. Statistiques et bilan génétique de l'IA en espèce caprine. *CapriIA*, Institut Elevage (Eds), Nov. 2002, Mignaloux Beauvoir, France, CR, 3309 p. 34.
- Boyazoglu, J., Flamant, J.C. 1990. Mediterranean systems of animal production. In: J.G. Galaty , D.L. Johnson , The world of pastoralism. New York, USA : Guilford Press. 354-393.
- Boyazoglu, J., Hatziminaoglou, Y. 2002. Livestock genetic resources and production systems: a Mediterranean overview. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 10, 62-67.
- Branca, A., Cappai, P. 1989. Osservazioni sul controllo della riproduzione nelle specie caprina: esperienze effettuate in sardegna. *Proceedings of Int. Symp. de La Riproduzionē nei piccoli ruminati: basi fisiologiche e aspetti applicativi.* pp. 115-129.
- Bravo, J.A., Montanero, J., Calero, R., Roy, T.J., 2014. Influence of season and reproductive management on the morphometry of ram sperm head. *Small Rumin. Res.* 119, 114-119.

- Brooks, D.E., 1990. Biochemistry of the male accessory glands. In: Lammings, GE (Ed.), Marshall's physiology of reproduction. (4th Edn.), Edinburgh, Churchill Livingstone. pp: 569-690.
- Bucak, M. N., Atessahin, A., Yuce, A. 2008. Effect of antioxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small. Rumin. Res.* 75, 128–134.
- Cabrera, F., Gonzalez, F., Batista, M., Calero, P., Medrano, A., Gracia, A., 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reprod. Domest. Anim.* 40, 191-195.
- Cameron, J., 2008. Guide de référence sur la photopériode. Publications techniques : Université Laval. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Canada, p. 138.
- Carrillo, E., 2006. Los machos cabríos sexualmente activos inducen la actividad sexual de las cabras anovulatorias con diferente proporción macho-hembras y en diferentes meses del anestro estacional. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
- Castañeda Arteaga, M.L., Martínez Gómez, M., Guevara Guzmán, R., Hudson, R., 2007. Comunicación química en mamíferos domésticos. *Vet. México* 38, 105-123.
- Chanvallon, A., Blache, D., Chadwick, A., Esmaili, T., Hawken, P.A., Martin, G.B., Vinales, C., Fabre-Nys, C., 2010. Sexual experience and temperament affect the response of Merino ewes to the ram effect during the anoestrous season. *Anim. Reprod. Sci.* 119, 205-211.
- Chemineau, P., 1983. Effect on oestrus and ovulation of exposing creole goats to the male at three times of the year. *J. Reprod. Fertil.* 67, 65-72.
- Chemineau, P., 1985. Effects of a progestagen on buck induced short ovarian cycles in the Creole meat goat. *Anim. Reprod. Sci.* 9, 87-94.
- Chemineau, P., 1986. Sexual behaviour and gonadal activity during the year in the tropical Creole meat goat. male mating behaviour, testis diameter, ejaculate characteristics and fertility. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 26, 453-460.
- Chemineau, P., F. Levy, and J. Thimonier. 1986. Effects of anosmia on LH secretion, ovulation and oestrous behavior induced by males in the anovular Creole goat. *Anim. Reprod. Sci.* 10, 125-132.
- Chemineau, P., Normant, E., Ravault, J.P., Thimonier, J., 1986. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *J. Reprod. Fertil.* 78, 497-504.
- Chemineau, P., 1987. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats-a review. *Livest. Prod. Sci.* 17, 135-147.
- Chemineau, P., Pelletier, J., Guerin, Y., Colas, G., Ravault, J.P., Toure, G., Almeida, G., Thimonier, J., Ortavant, R., 1988. Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reprod. Nutr. Dev.* 28, 409-422.
- Chemineau, P., 1989. L'effet bouc : mode d'action et efficacité pour stimuler la reproduction des chèvres en anoestrus. *INRA Prod. Anim.* 2, 97-104.
- Chemineau, P., Daveau, A., Maurice, F., Delgadillo, J.A., 1992a. Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Rumin. Res.* 8, 299-312.
- Chemineau, P., Daveau, A., Maurice, F., Delgadillo, J.A., 1992b. Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Rumin. Res.* 8, 299-312.
- Chemineau, P., Delgadillo, J.A., 1994. Neuroendocrinologie de reproduction chez les caprins. *INRA Prod. Anim.*, 315-326.
- Chemineau, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., 1998. Photopériodisme et reproduction chez les caprins. Communication présentée au Colloque Reproduction caprine : nouveaux contextes, derniers acquis.
- Chemineau, P., Baril, G., Leboeuf, B., Maurel, M.C., Roy, F., Pellicer-Rubio, M., Malpaux, B., Cognie, Y., 1999. Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 54, 129-142.
- Chemineau, P., Pellicer-Rubio, M., Lassoued, N., Khaldi, G., Monniaux, D., 2006. Male-induced short oestrous and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 417– 429.

- Chemineau, P., Guillaume, D., Migaud, M., Thiery, J.C., Pellicer-Rubio, M.T., Malpaux, B., 2008. Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod. Domest. Anim.* 43 Suppl 2, 40-47.
- Chemineau P., Bodin L., Migaud M, Thiéry J.C., Malpaux B. 2010. Neuroendocrine and Genetic Control of Seasonal Reproduction in Sheep and Goats. *Reprod. Dom. Anim.* 45. 42-49.
- Chentouf, M., Ayadi, M., Boulanouar, B. 2004. Typologie des élevages caprins dans la province de Chefchaouen: Fonctionnement actuel et perspectives. *Options Méditerranéennes* 61. 255-261
- Chentouf, M., Ben Bati, M., Zantar, S., Boulanouar, B., Bister, J.L. 2006. Evaluation des performances des élevages caprins extensifs dans le Nord du Maroc. *Options Méditerranéennes* 70. 87-94.
- Chentouf, M., 2007. Physiologie de la reproduction et productivité de la chèvre locale du Nord du Maroc. Thèse de doctorat, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur.
- Chentouf, M., Arrebola Molina, F., Boulanouar, B., Mesbahi, H., Terradillos, A., Caravaca, F., Casas, C., Bister, J.L. 2009. Caractérisation des systèmes de production caprine semi-extensifs en Andalousie et au Nord du Maroc : analyse comparative. *Options Méditerranéennes* 91. 37-41
- Chentouf, M., Bister, J.L., Boulanouar, B., 2011. Reproduction characteristics of North Moroccan indigenous goats. *Small Rumin. Res.* 98, 185-188.
- Chentouf, M., Bister, J.L., 2011. Light treated bucks induce a well synchronized estrus and LH peak during anestrus season by male effect in North Moroccan goats, 62nd Annual Meeting of European Association of Animal Production, August 29th – September 2nd 2011, Stavanger, Norway.
- Chentouf, M., Bister, J.L., 2012. Effect of different extenders on caprine semen conservation at 4 degrees C. 11th International Congress of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA). *Reprod. Domest. Anim.*, Córdoba, Spain, p. 109.
- Chentouf, M., Boulanouar, B., Benlekhal, A. 2014. Situation actuelle de l'élevage caprin au Nord du Maroc. INRA-Editions. Pp, 11-34. ISBN: 978-9954-34-872-7.
- Choe, C.-Y., Kim, J.-G., Cho, S.-R., Son, D.-S., Kim, Y.-K., Balasubramanian, S., Choe, S.-Y., Rho, G.-J., 2006. Influence of Seasons, Extenders, Slow and Rapid Freezing on Seminal Characters in Korean Native Bucks. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 55-60.
- Colas, G., Laszczka, A., Brice, G., Ortavant, R., 1972 Seasonal variations in semen production in the ram. *Acta Agraria et Silvestria Series Zootechnia* 12, 3-15.
- Collectif, Lebrogne, M.-C., Tanguy, J.M., 2014. Reproduction des animaux d'élevage Educagri Editions, Dijon.
- Collin, S., Sirard, M.A., Dufour, M., Bailey, J.L. 2000. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. *J Androl.* 21. 938-943.
- Corteel, J.M., Mauleon, P., Thimonier, J., Ortavant, R., 1968. Recherches expérimentales de gestations synchrones avant le début de la saison sexuelle de la chèvre après administration vaginale d'acétate de fluorogestone et injection intramusculaire de PMSG. . 6th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insémination, 22–26 Juillet 1968, Paris (France) pp. 1411–1412.
- Corteel, J.M., Baril, G., 1975. Effet du «lavage» sur la conservation des spermatozoïdes de boucs à basse température. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 15, 525-528.
- Corteel, J.M., Baril, G., Leboeuf, B., De Montigny, G., Beaudet, Y., 1976. Variations de la motilité et de la fécondance des spermatozoïdes de bouc. *Ann. Zootech.* 25, 567-571.
- Corteel, J.M., 1977. Production, storage and insemination of goat semen. Symposium on Management of Reproduction in Sheep and Goats, University of Wisconsin, pp. 41-57.
- Corteel, J.M., Leboeuf, B., Baril, G., 1988. Artificial breeding of adult goat and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Rumin. Res.* 1, 19–35.
- Corteel, J.M., Leboeuf, B. 1990. Evolution techno-économique de l'insemination artificielle caprine. *Elevage Insémination* 237.3-17.
- Cox, J.F., Alfaro, V., Montenegro, V., Rodriguez-Martinez, H., 2006. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology* 66, 860-867.



- Cseh, S., Faigl, V., Amiridis, G.S., 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminant. *Anim. Reprod. Sci.* 130, 187-192.
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., 2003. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Anim. Reprod. Sci.* 79, 93-102.
- Dardente H., Lomet D., Vincent R., Caroline D. Beltramo M., Pellicer-Rubio M. T. 2016. Seasonal breeding in mammals: From basic science to applications and back. *Theriogenology*. 86.324-332.
- Daudu, C.S., 1984. Spermatozoa output, testicular sperm reserve and epididymal storage capacity of the Red Sokoto goats indigenous to northern Nigeria. *Theriogenology* 21, 317-324.
- de Kretser, D.M., Meinhardt, A., Meehan, T., Phillips, D.J., O'Bryan, M.K., Loveland, K.A., 2000. The roles of inhibin and related peptides in gonadal function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 161, 43-46.
- De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 2. 48-54.
- Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1991. Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 36, 755-770.
- Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Rumin. Res.* 9, 47-59.
- Delgadillo, J.A., Chemineau, P., 1992. Abolition of the seasonal release of luteinising hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. *J. Reprod. Fertil.* 94, 45-55.
- Delgadillo, J.A., Malpaux, B., Chemineau, P., 1997. La reproduction des caprins dans les zones tropicales et subtropicales. *INRA Prod. Anim.* 10, 33-41.
- Delgadillo, J.A., Carrillo, E., Moran, J., Duarte, G., Chemineau, P., Malpaux, B., 2001. Induction of sexual activity of male creole goats in subtropical northern Mexico using long days and melatonin. *J. Anim. Sci.* 79, 2245-2252.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Veliz, F.G., Hernandez, H.F., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P., Malpaux, B., 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *J. Anim. Sci.* 80, 2780-2786.
- Delgadillo, J.A., Cortez, M., Duarte, G., Chemineau, P., Malpaux, B., 2004. Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 183-193.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Veliz, F.G., Duarte, G., Vielma, J., Hernandez, H., Fernandez, I.G., 2006. Importance of the signals provided by the buck for the success of the male effect in goats. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 391-400.
- Delgadillo, J.A., Gelez, H., Ungerfeld, R., Hawken, P.A., Martin, G.B., 2009. The 'male effect' in sheep and goats-revisiting the dogmas. *Behav. Brain. Res.* 200, 304-314.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Hernández, H., Poindron, P., Keller, M., Fitz-Rodríguez, G. 2015. Sexually active males prevent the display of seasonal anestrus in female goats, *Horm. Behav.* 69. 8–15
- Del Olmo, E., Bisbal, A., Maroto-Morales, A., Garcia-Alvarez, O., Ramon, M., Jimenez-Rabadan, P., Martinez-Pastor, F., Soler, A.J., Garde, J.J., Fernandez-Santos, M.R., 2013. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Anim. Reprod. Sci.* 138, 102-109.
- Derashri, H.J., Bansal, K.K., Sharma, A.K., Verma, S.K. 1992. Reproduction in bucks, spermatogenesis, duration of seminiferous epithelial cycle and germ cell degeneration. In: Pre-Conference Proceedings Abstracts of Contributory Papers, Volume I, International Conference on Goats, New Delhi, March 2-8, pp 263.
- Díaz Delfa, C., González-Bulnes, A., Haba Nuévalos, E., Guirao Moya, J., Lobera, Lössel, J.B., Urrutia López, B., Carrizosa Durán, J.A., López Sebastián, A., 2002. Inducción y sincronización de ovulaciones en cabras de la raza murcianogranadina, mediante la utilización del efecto macho y progesterona. *Proceedings of XXVII Jornadas Científicas y VI Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia.* pp. 1017-1021.

- Dogan, I., Nur, Z., Dogan, S., 2016. Different progestagen treatment duration on estrous synchronization during the natural breeding season in non-lactating Anatolian black goats. *Anim. Reprod.* 13, 806-810.
- Dolatpanah, M.B., Towhidi, A., Farshad, A., Rashidi, A., Rezayazdi, A., 2008. Effects of Dietary Fish Oil on Semen Quality of Goats. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21, 29-34.
- Douk, A., 1996. Variations saisonnières de la taille testiculaire et des caractéristiques du sperme chez le caprin noir de montagne. Thèse de doctorat vétérinaire. I.A.V. Hassan II, Rabat, Maroc.
- Drion, P.V., Furtoss, V., Baril, G., Manfredi, E., Bouvier, F., Pournard, J.L., Bernelas, D., Caugnon, P., McNamara, E.M., Remy, B., Sulon, J., Beckers, J.F., Bodin, L., Lebceuf, B., 2001. Four years of induction/synchronization of estrus in dairy goats: effect on the evolution of eCG binding rate in relation with the parameters of reproduction. *Reprod. Nutr. Dev.* 41, 401-412.
- Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats / Gareth Evans, W.M.C. Maxwell, Butterworths, Sydney.
- FAOSTAT. 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations the State of Food Insecurity in the World. Available at: <http://faostat3.fao.org/>.
- Fatet, A., Pellicer-Rubio, M.T., Leboeuf, B., 2011. Reproductive cycle of goats. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 211-219.
- Fernandez, I.G., Luna-Orozco, J.R., Vielma, J., Duarte, G., Hernandez, H., Flores, J.A., Gelez, H., Delgadillo, J.A., 2011. Lack of sexual experience does not reduce the responses of LH, estrus or fertility in anestrus goats exposed to sexually active males. *Horm. Behav.* 60, 484-488.
- Flores, J.A., Veliz, F.G., Perez-Villanueva, J.A., Martinez De La Escalera, G., Chemineau, P., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2000. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biol. Reprod.* 62, 1409-1414.
- Fonseca, J.F., Torres, C.A., 2005. Administration of hCG 5 days after breeding and reproductive performance in nulliparous dairy goats. *Reprod. Domest. Anim.* 40, 495-499.
- França, L.R., Becker-Silva, S.C., Chiarini-Garcia, H. 1999. The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). *Tissue. Cell.*, 31, 274-280.
- Freitas, V.J.F., Baril, G., Saumande, J., 1996. Induction and synchronization of estrus in goats: The relative efficiency of one versus two Fluoregestone Acetate impregnated vaginal sponges. *Theriogenology* 46, 1251-1256.
- Fresno, M., Alvarez, S., Darmanin, N., Delgado, J.V., Leboeuf, B., Terqui, M., 2000. Testis volume and semen production in Canarian goats. 7th International conference on Goats Tours, France, p. 439.
- Gadea, J., 2003. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Span. J. Agric. Res.* 1, 17-27.
- Gallego-Calvo, L., Gatica, M.C., Santiago-Moreno, J., Guzmán, J.L., Zarazaga, L.A., 2015. Seasonal changes in reproductive activity, sperm variables and sperm freezability in Blanca Andaluza bucks. *Span. J. Agric. Res.* 13, 1-10.
- Gama, L.T., Bressan, M.C., 2011. Biotechnology applications for the sustainable management of goat genetic resources. *Small Rumin. Res.* 98, 133-146.
- Gelez, H., Fabre-Nys, C., 2004. The “male effect” in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. *Hormon. behav.* 46, 257-271.
- Gilles, R., Anctil, M., Baguet, F., Charmantier, M., Charmantier, G., Péqueux, A., et al., 2006. *Physiologie animale*. Edition De Boeck et Larciens. a., 677P
- Ginther, OJ, Kot, K., 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology* 42, 987-1001.
- Gomez, E., Irvine, D.S., Aitken, R.J. 1998. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Inter. J. Androl.* 21, 81-94.
- Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., Toledano-Diaz, A., López-Sebastián, A., 2012. Reproductive seasonality and its control in Spanish sheep and goats. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 15.
- Gonçalves, F., Barretto, L., Arruda, R.P., Perri, S., Mingoti, G.Z. 2010. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod. Domest. Anim.* 45(1), 129-135.

- Greyling, J., Grobbelaar, J., 1983. Seasonal variation in semen quality of Boer and Angora goat rams using different collection techniques. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 13, 2015-2252.
- Greyling, J.P., 2000. Reproduction traits in the Boer goat doe. *Small Rumin. Res.* 36, 171-177.
- Herve, V., Roy, F., Bertin, J., Guillou, F., Maurel, M.C., 2004. Antiequine chorionic gonadotropin (eCG) antibodies generated in goats treated with eCG for the induction of ovulation modulate the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone bioactivities of eCG differently. *Endocrinology* 145, 294-303.
- Hidalgo, M., Dorado, J., 2009. Objective assessment of goat sperm head size by computer-assisted sperm morphometry analysis (ASMA). *Small Rumin. Res.* 87, 108-110.
- Holtz, W., 2005. Recent developments in assisted reproduction in goats. *Small Rumin. Res.* 60, 95-110.
- Holtz, W., Sohnrey, B., Gerland, M., Driancourt, M.A., 2008. Ovsynch synchronization and fixed-time insemination in goats. *Theriogenology* 69, 785-792.
- Hotzel M.J., Walkden-Brown S.W., Fisher J.S., Martin G.B., 2003. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheeep: responses to a nutritional stimulus in the breeding and non-breeding seasons. *Reprod. Fertil. Dev.* 15, 1-9.
- Iwata, E., Wakabayashi, Y., Kakuma, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., 2000. Testosterone-dependent primer pheromone production in the sebaceous gland of male goat. *Biol. Reprod.* 62, 806-810.
- Jarosz, S.J., Deans, R.J., Dukelow, W.R., 1971. The reproductive cycle of the African Pygmy and Toggenburg goat. *J. Reprod. Fertil.* 24, 119-123.
- Jiang, Y.F., Hsu, M.C., Cheng, C.H., Tsui, K.H., Chiu, C.H., 2016. Ultrastructural changes of goat corpus luteum during the estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 170, 38-50.
- Jiménez-Rabadán, P., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Del Olmo, E., Pérez-Guzmán, M., Soler, A., 2012. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Anim. Reprod. Sci.* 132 (1), 88-95.
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniestas Guerda, M., Fernandez-Santos, M., Montoro, V., Perez-Guzman, M., Garde, J. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 167, 103-108.
- Jout, J. 2014. Recommandations de la journée d'étude sur le développement de la filière caprine dans la région de Tanger – Tétouan. 12ème Edition de la Foire Caprine de Chefchaouen. 4 et 5 décembre, Chefchaouen, Maroc.
- Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Karatzas, G., 2000. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology* 53, 1285-1293.
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., John Edwin, M., Veerapandian, C., 2008. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 9-17.
- Knight, T.W., McWilliam, W.H., Kannegieter, S.G., Sorensen, E.S., Ridland, C.J., Gibb, M., 1989. Mating Romney ewes in November-December using CIDRs and pregnant mare serum gonadotropin. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 225-260.
- Knights, M., Singh-Knights, D., 2016. Use of controlled internal drug releasing (CIDR) devices to control reproduction in goats: A review. *Anim. Sci. J.* 87, 1084-1089.
- Koppers, A.J., De Iuliis, G.N., Finnie, J.M., McLaughlin, E.A., Aitken, R.J. 2008. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 93. 3199-3207.
- Kridli, R.T., Tabbaa, M.J., Barrakeh, F.S., 2007. Seasonal Variation in Scrotal Circumference and Semen Characteristics of black Bedouin and Black Bedouin Damascus Crossbred Bucks. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20, 359-364.
- Kundu, C.N., Chakraborty, J., Dutta, P., Bhattacharyya, D., Ghosh, A., Majumder, G.C., 2000. Development of a Simple Sperm Cryopreservation Model Using a Chemically Defined Medium and Goat Cauda Epididymal Spermatozoa. *Cryobiology* 40, 117-125.

- Kusina, N.T., Tarwirei, Hamudikuwanda, H., Agumba, G., Mukwena, J., 2000. A comparison of the effects of progesterone sponges and ear implants, PGF2alpha, and their combination on efficacy of estrus synchronization and fertility of Mashona goat does. *Theriogenology* 53, 1567-1580.
- La Faldi, V.S.N., Tortorella, H., Rodrigues, J.L., Brandelli, A., 2002. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology* 57, 1035-1048.
- Labbé, C., Blesbois, E., LEBOEUF, B., MARTORIATI, A., Guillouet, P., Stradaoli, G., Magistrini, M., 2003. Technologie de la conservation du sperme chez plusieurs vertébrés domestiques: protection des lipides membranaires, intégrité du noyau et élargissement des méthodes Les Actes du BRG 4, 143-157.
- Lassoued, N., Khaldi, G., Cognié, Y., Chemineau, P., Thimonier, J., 1995. Effet de la progestérone sur le taux d'ovulation et la durée du cycle ovarien induits par effet mâle chez la brebis Barbarine et la chèvre locale tunisienne. *Reprod. Nutr. Dev.* 35, 415-426.
- Leboeuf, B., 1992. Extensive application of Artificial Insemination in goats. *Proceedings of the fifth International Conference on Goats*, New-Delhi pp. 298-308.
- Leboeuf, B., Renaud, G., De Fontaubert, Y., Broqua, B., Chemineau, P., 1994. Echographie et pseudogestation chez la chèvre. *Proceedings of the 7th International Meeting on Animal Reproduction*, Murcia pp. 251-255.
- Leboeuf, B., Baril, G., Maurel, M.C., Bernelas, D., Marcheteau, J., Berson, Y., Broqua, B., Terqui, M., 1996. Effect of progestagenrPMSG repeated treatments in goats on fertility following artificial insemination *Proc. 6th Int. Conf. on Goats*, Beijing
- Leboeuf, B., Manfredi, E., Boué, P., piacer, A., Brice, G., Baril, G., Broqua, C., Humblot, P., Terqui, M., 1998. Artificial insemination of dairy goats in France. *Livest. Prod. Sci.* 55, 193-203.
- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000. production and storage of semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 113-141.
- Leboeuf, B., Forgerit, Y., Bernelas, D., Pougard, J.L., Senty, E., Driancourt, M.A., 2003a. Efficacy of two types of vaginal sponges to control onset of oestrus, time of preovulatory LH peak and kidding rate in goats inseminated with variable numbers of spermatozoa. *Theriogenology* 60, 1371-1378.
- Leboeuf, B., Guillouet, P., Batellier, F., Bernelas, D., Bonne', J.L., Forgerit, Y., Renaud, R., Magistrini, M., 2003b. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. *Theriogenology* 60, 867-877.
- Leboeuf, B., Guillouet, P., Bonne', J.L., Forgerit, Y., Magistrini, M., 2004. Goat semen preserved at 4 °C until 76 hours before artificial insemination: Different attempts to maintain the fertility. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34, 233-235.
- Lindsay, D.R., Signoret, J.P., 1980. Influence of behaviour on reproduction. *9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, 16th-20th June 1980. I. Plenary sessions. , pp. 83-92.
- Liu, C.H., Dong, H.B., Ma, D.L., Li, Y.W., Han, D., Luo, M.J., Chang, Z.L., Tan, J.H., 2016. Effects of pH during liquid storage of goat semen on sperm viability and fertilizing potential. *Anim. Reprod. Sci.* 164, 47-56.
- Lopez-Sebastian, A., Gonzalez-Bulnes, A., Carrizosa, J.A., Urrutia, B., Diaz-Delfa, C., Santiago-Moreno, J., Gomez-Brunet, A., 2007. New estrus synchronization and artificial insemination protocol for goats based on male exposure, progesterone and cloprostenol during the non-breeding season. *Theriogenology* 68, 1081-1087.
- Lopez-Sebastian, A., Coloma, M.A., Toledano, A., Santiago-Moreno, J., 2014. Hormone-free protocols for the control of reproduction and artificial insemination in goats. *Reprod. Domest. Anim.* 49 Suppl 4, 22-29.
- Loubser, P.G., Van Niekerk, C.H. & Botha, L.J.J., 1983. Seasonal changes in activity and semen quality in the Angora ram. 1. Libido and male hormone concentrations. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 13, 131-133.
- Loya-Carrera, J., Bedos, M., Ponce-Covarrubias, J.L., Hernandez, H., Chemineau, P., Keller, M., Delgadillo, J.A. 2014. Switching photo-stimulated males between groups of goats does not improve the reproductive response during the male effect. *Anim. Reprod. Sci.* 146. 21-26.

- Manjunath, P. 2012. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim. Reprod.* 9, 809-815.
- Mapletoft, R.J., Steward, K.B., Adams, G.P., 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 601-611.
- Marco-Jiménez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J.S., Viudes-de-Castro, M.P. 2005. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 64, 1756-1765.
- Marco-Jiménez, F., Vicente, J., Viudes-de-Castro, M., 2008. Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. *Reprod. Dom. Anim.* 43, 403-408.
- Marti, E., Mara, L., Marti, J.I., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J.A., 2007. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology* 67, 1446-1454.
- Martin, G.B., Scaramuzzi, R.J., 1983. The induction of oestrus and ovulation in seasonally anovular ewes by exposure to rams. *J. Steroid. Biochem.* 19, 869-875.
- Martin, G.B., Walkden-Brown, S.W., 1995. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. *J. Reprod. Fertil.* 49, 437-449.
- Martin, G.B., Milton, J.T.B., Davidson, R.H., Banchero Hunzicker, G.E., Lindsay, D.R., Blache, D., 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 231-246.
- Martin, G.B., Blache, D., Miller, D.W., Vercoe, P.E., 2010. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. *Animal* 4, 1214-1226.
- Martinez-Rodriguez, C., Alvarez, M., Lopez-Uruena, E., Gomes-Alves, S., Anel-Lopez, L., Tizado, J.E., Anel, L., de Paz, P., 2015. Head morphology of ram spermatozoa is associated with their ability to migrate in vitro and correlates with fertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 28, 1825-1837.
- Maxwell, W.M., Salamon, S., 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 613-638.
- McPartlin L.A., Suarez S.S., Czaya C.A., Hinrichs K., Bedford-Guaus S.J. 2009. Hyperactivation of Stallion Sperm Is Required for Successful In Vitro Fertilization of Equine Oocytes. *Biol. Reprod.* 81. 199-206.
- Medan, M.S., Takedom, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Yazawa, S., Watanabe, G., Taya, K., 2006. The effect of active immunization against inhibin on gonadotropin secretions and follicular dynamics during the estrous cycle in cows. *J. Reprod. Dev.* 52, 107-113.
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., Rodrigues, J.L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57. 327-344.
- Ménard, M., Nauc, V., Lazure, C., Vaillancourt, D., Manjunath, P., 2003. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of proteins in stallion seminal fluid. *Mol. Reprod. Dev.* 66, 349-357.
- Menchaca, A., Rubianes, E., 2007. Pregnancy rate obtained with short-term protocol for timed artificial insemination in goats. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 590-593.
- Meyer, C., Teinkam, D., 2010. The male effect on small ruminants: A review. *Livest. Res. Rural. Dev.* 22.
- Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime. Situation de l'Agriculture Marocaine N°10. MAPM (Ed) ; 2017, 187p.
- Modu-Bukar, M., Yusoff, R., Haron, A.W., 2012. Estrus response and follicular development in Boer does synchronized with flugestone acetate and PGF2 $\alpha$  or their combination with eCG or FSH. *Trop. Anim. Health. Prod.* 44, 1505-1511.
- Montlomo, K.C., Greyling, J.P.C., Schwalbach, L.M., 2002. Synchronisation of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments. *Small Rumin. Res.* 45, 45-49.
- Molinia, F.C., Evans, G., Maxwell, W.M.C. 1994. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.* 34, 491-500.
- Mori, Y., Kano, Y., 1984. Changes in plasma concentrations of LH, progesterone and oestradiol in relation to the occurrence of luteolysis, oestrus and time of ovulation in the Shiba goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fertil.* 72, 223-230.
- Mortimer D., Mortimer S.D. 2013. Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation. *Methods and Protocols, Methods. Mol. Biol.* 927.77- 87

- Muhuyi, E.Z., Drobnis, E.Z., Nelxon, E.A., Lin, T.Y., 1992 Season, breed and age influence on production and freezability of dairy goat semen. 3rd International Conference on Goats Prod. Disease., Tucson, Arizona, USA, p. 283.
- Murata, K., Wakabayashi, Y., Kitago, M., Ohara, H., Watanabe, H., Tamogami, S., Warita, Y., Yamagishi, K., Ichikawa, M., Takeuchi, Y., Okamura, H., Mori, Y., 2009. Modulation of gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity by the pheromone in small ruminants. *J. Neuroendocrinol.* 21, 346-350.
- Mushtaq, A., Ullah, M., Hussain, N., Ahmad, M., Tahiran, M., Ahmad, N., 2015. Effect of skim milk and egg yolk in Tris based extender on liquid storage of buck semen. *International Symposium on Dairy Animal Reproduction (ISDAR)*, pp. 5-15.
- Nava-Trujillo, H., Chango-Villasmil, J., Finol-Parra, G., Torres-Rodríguez, P., Carrillo-Fernández, F., Maldonado-Suárez, J., Gil-Huerta, L., Akourki, A., 2010. Effect of eCG dosage on estrus induction in crossbred goats after a short-term medroxyprogesterone treatment. *Rev. Cientific. FCV-LUZ* 20, 181-183.
- O'Donnell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R. 2001. Estrogen and Spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 22, 289-318.
- O'Hara, L., Hanrahan, J.P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A.C., Lonergan, P., 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology* 73, 541-549.
- Parkinson, T., 2009. In: Noakes, D.E., Parkinson, T.J., England, G. C.W. (Ed.), *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 9th ed. Saunders-Elsevier. London, UK, pp. 681–806.
- Parks, J.E., Mecham, T.N., Saacke, R.G. 1981. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. II. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids, and viability at 4°C and 37°C. *Biol. Reprod.* 24, 399-404.
- Pellicer-Rubio, M., Magallon, T., Combarous, Y., 1997. Deterioration of Goat Sperm Viability in Milk Extenders Is Due to a Bulbourethral 60-Kilodalton Glycoprotein with Triglyceride Lipase Activity. *Biol. Reprod.* 57, 1023-1031.
- Pellicer-Rubio, M.T., Combarous, Y., 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J. Reprod. Fertil.* 112, 95-105.
- Pellicer-Rubio, M.T., Leboeuf, B., Bernelas, D., Forgerit, Y., Pougard, J.L., Bonne, J.L., Senty, E., Chemineau, P., 2007. Highly synchronous and fertile reproductive activity induced by the male effect during deep anoestrus in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. *Anim. Reprod. Sci.* 98, 241-258.
- Pellicer-Rubio, M.T., Leboeuf, B., Bernelas, D., Forgerit, Y., Pougard, J.L., Bonné, J.L., Senty, E., Breton, S., Brun, F., Chemineau, P., 2008. High fertility using artificial insemination during deep anoestrus after induction and synchronisation of ovulatory activity by the “male effect” in lactating goats subjected to treatment with artificial long days and progestagens. *Anim. Reprod. Sci.* 109, 172–188.
- Perez, B., Mateas, E., 1996. Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malaguena breeds. *Small Rumin. Res.* 22, 163-168.
- Perez-Pe, R., Cebrian-Perez, J.A., Muino-Blanco, T., 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology* 56, 425-434.
- Perkins, A., Fitzgerald, J.A., 1994. The behavioral component of the ram effect: the influence of ram sexual behavior on the induction of estrus in anovulatory ewes. *J Anim. Sci.* 72, 51-55.
- Pierson, J.T., Baldassarre, H., Keefer, C.L., Downey, B.R., 2001. Seasonal variation in preovulatory events associated with synchronization of estrus in dwarf goats. *Theriogenology* 56, 759-769.
- Pomares, C.C., Stojanov, T., Eppleston, J., Maxwell, W.M.C., 1994 Effect of glutathione peroxidase on the survival of goat and ram spermatozoa during liquid storage. 7th Int. Symp. On Spermatology, Cairns, p. 24.
- Ponce, J.L., Velázquez, H., Duarte, G., Bedos, M., Hernández, H., Keller, M. 2014. Reducing exposure to long days from 75 to 30 days of extra-light treatment does not decrease the capacity of male goats to

- stimulate ovulatory activity in seasonally anovulatory females. *Domest. Anim. Endocrinol.* 48, 119–125.
- Purdy, P.H., 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin. Res.* 63, 215-225.
- Rahman, M. B., Vandaele, L., Rijsselaere, T., Maes, D., Hoogewijs, M., Frijters, A., Noordman, J., Granados, A., Dernelle, E., Shamsuddin, M., Parrish, J. J., and Van Soom, A., 2011. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. *Theriogenology* 76, 1246-1257.
- Rahman, M.B., Schellander, K., Luceno, N.L., and Van Soom, A., 2018. Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. *Theriogenology*. 113, 102-112.
- Restall, B., 1992. Seasonal variation in reproductive activity in Australian goats. *Anim. Reprod. Sci.* 27, 305-318.
- Riaz, H., Sattar, A., Arshad, M., Ahmad, N., 2012. Effect of synchronization protocols and GnRH treatment on the reproductive performance in goats. *Small Rumin. Res.* 104, 151-155.
- Ricordeau, G., Bouillon, J., Gaillard, A., Lajous, A., Lajous, D., 1984. Modalités et caractéristiques de reproduction chez les caprins. *Aspects génétiques* 391, 367-383.
- Ritar, A.J., Ball, P.D., O'May, P.J., 1990. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. *Reprod. Fertil. Dev.* 2, 377-384.
- Ritar, A.J., Salamon, S., 1991. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Rumin. Res.* 4, 29-37.
- Ritar, A.J., Mendoza, G., Salamon, S., White, I.G., 1992. Frequent semen collection and sperm reserves of the male Angora goat (*Capra hircus*). *J. Reprod. Fertil.* 95, 97-102.
- Rivas-Muñoz, R., Fitz-Rodríguez, G., Poindron, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., 2007. Stimulation of estrous behavior in grazing female goats by continuous or discontinuous exposure to males. *J. Anim. Sci.* 85, 1257-1263.
- Roca, J., Martinez, E., Vazquez, J.M., Coy, P., 1992. Characteristics and seasonal variation in the semen of Murciano-Granadina goats in the Mediterranean area. *Anim. Reprod. Sci.* 29, 255-262.
- Roca, J., Carrizosa, J.A., Campos, I., Laufuente, A., Vazquez, J.M., Martinez, E., 1997. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Rumin. Res.* 25, 147-153.
- Roof, D.J., Bowley, S., Price, L.L., Matsas, D.J., 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology* 77, 412-420.
- Rosa, H.J.D., Bryant, M.J., 2002. The 'ram effect' as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. *Small Rumin. Res.* 45, 1-16.
- Rosa, D.J., Bryant, M.J., 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin. Res.* 48, 155–171.
- Roser, J.F., 2011. Endocrine-Paracrine-Autocrine Regulation of Reproductive Function in the Stallion. In: Mc KINNON AO, SQUIRES EL, VAALA WE, VARNER DD (eds), *Equine Reproduction*, 2ed., United Kingdom, Wiley-Blackwell, pp. 996-1014.
- Roy, F., Maurel, M.C., Combes, B., Vaiman, D., Cribiu, E.P., Lantier, I., Pobel, T., Deletang, F., Combarnous, Y., Guillou, F., 1999. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. *Biol. Reprod.* 60, 805-813.
- Salamon, S., Maxwell, W.M., 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 77-111.
- Sanocka, D., Kurpisz, M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrino.* 2 (12). doi:10.1186/1477-7827-2-12.
- Santiago-Moreno, J., Coloma, M., Dorado, J., Pulido-Pastor, A., GómezGuillamon, F., Salas-Vega, R., 2009. Cryopreservation of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electro-ejaculation outsider the rutting season. *Theriogenology* 71, 1253–1260.

- Sanz, L., Calvete, J.J., Mann, K., Gabius, H., Töpfer-Petersen, E., 1993. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: A dual role for spermadhesins in fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 35, 37-43.
- Shelton, M., 1960. Influence of the Presence of a Male Goat on the Initiation of Estrous Cycling and Ovulation of Angora Does. *J. Anim. Sci.* 12, 368-375.
- Shelton, M., 1978. Reproduction and breeding of goats. *J. Dairy Sci.* 61, 994-1010.
- Shelton, M., 1980. Goats: Influence of various exteroceptive factors on initiation of oestrus and Int. Goat. Sheep. Res. 1, 156-162.
- Signoret, J.P., 1980. Effet de la présence du mâle sur les mécanismes de reproduction chez la femelle des mammifères *Reprod. Nutr. Dev.* 20, 457-468.
- Simpson, A.M., White, I.G. 1986. Effect of cold shock and cooling rate on calcium uptake of ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 12, 131-143.
- Stojanov, T., Pomares, C.C., Maxwell, W.M.C., Eppleston, J., 1994 Effect of cytochrome c on the survival of ram and goat spermatozoa during liquid storage. 7 as Jornadas Internacionales de Reproduccion Animal Murcia, p. 333.
- Stormshak, F., Estill, C.T., Resko, J.A., Roselli, C.E. 2008. Changes in LH secretion in response to an estradiol challenge in male- and female-oriented rams and in ewes. *Reprod.* 135, 733–738.
- Suarez, S.S., Pacey, A.A. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update.* 12, 23–37.
- Summermatter, P., Flukiger, A., 1982. Buck semen processing during off breeding season 3rd International Conference on Goats Prod. Disease, Tucson, AZ, USA, p. 284.
- Sutherland, S., 1987. Why hermaphroditic plants produce many more flowers than fruits : Experimental tests with agave Mckelveyana. *Evolution* 41, 750-759.
- Talebi, J., Souri, M., Moghaddam, A., Karimi, I., Mirmahmoodi, M., 2009. Characteristics and seasonal variation in the semen of Markhoz bucks in western Iran. *Small Rumin. Res.* 85, 18-22.
- Thibault, C., Levasseur, M.C., 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme, Paris.
- Thimonier, J., 1996. Photopériode et Reproduction. *INRA Prod. Anim.* 9, 3-8.
- Thimonier, J., Cognie, Y., Lassoued, N., Khaldi, G., 2000. L'effet male chez les ovins: une technique actuelle de maîtrise de la reproduction. *INRA Prod. Anim.* 13, 223–231.
- Tilbrook, A.J., de Kretser, D.M., Clarke, I.J., 1992. A role for inhibin in the regulation of the secretion of follicle stimulating hormone in male domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 9, 243-260.
- Tirpan, M.B., Tekin, K., Cil, B., Alemdar, H., Inanc, M.E., Olgac, K.T., Stelletta, C., Daskin, A., 2018. The effects of different PMSG doses on estrus behavior and pregnancy rate in Angora goats. *Animal*, 1-6.
- Todini, L., Malfatti, A., Terzano, G.M., Borghese, A., Pizzillo, M., Debenedetti, A., 2007. Seasonality of plasma testosterone in males of four Mediterranean goat breeds and in three different climatic conditions. *Theriogenology* 67, 627-631.
- Tuli, R.K., Holtz, W., 1992. The effect of season on seminal characters in Boer goat bucks in the Northern temperate zone. p. 1195-1200. . In: (ed.), R.a.i.g.p. (Ed.), Lokeshwar, New Delhi.
- Tuli, R.K., Holtz, W., 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and got-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 42, 547-555.
- Tuli, R.K., Holtz, W., 1995. Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperate zone. *Theriogenology* 43, 1359-1363.
- Tummaruk, P., Lundeheim, N., Einarsson, S., Dalin, A.-M., 2000. Factors influencing age at first mating in purebred Swedish Landrace and Swedish Yorkshire gilts. *anim. Reprod. Sci.* 63, 241-253.
- Turri, F., Madeddu, M., Gliozzi, T.M., Gandini, G., Pizzi, F., 2016. Relationship between body weight, sexual secondary traits and epididymal semen quality in the Alpine goat. *Small Rumin. Res.* 135, 81-84.
- Underwood, E., Shier, F., Davenport, N., 1994. Studies in sheep husbandry in Western Australia. V. The breeding season of Merino, crossbred and British breed ewes in agricultural districts. *J. Dept. Agric.* 21, 135–143.



- Ungerfeld, R., Ramos, M.A., Gonzalez-Pensado, S.P. 2008. Ram effect: adult rams induce a greater reproductive response in anestrus ewes than yearling rams. *J Anim. Reprod. Sci.* 103, 271–277.
- Upreti, G.C., Jensen, K., Munday, R., Duganzich, D.M., Vishwanath, R., Smith, J.F. 1998. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim. Reprod. Sci.* 5, 275-287.
- Upreti, G.C., Hall, E.L., Koppens, D., Oliver, J.E., Vishwanath, R., 1999. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 56, 107-121.
- Van Rensburg, S.J., 1971. Reproductive physiology and endocrinology of normal and habitually aborting angora goats. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 38, 1-62.
- Vázquez-Armijo, J.F., Rojo, R., López, D., Tinoco, J.L., González, A., Pescador, N., Domínguez-Vara, I.A., 2011. Trace elements in sheep and goats reproduction: a review. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 14, 1-13.
- Veliz, F.G., Moreno, S., Duarte, G., Vielma, J., Chemineau, P., Poindron, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., 2002. Male effect in seasonally anovulatory lactating goats depends on the presence of sexually active bucks, but not estrous females. *Anim. Reprod. Sci.* 72, 197-207.
- Veliz, F.G., Poindron, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., 2006. Maintaining contact with bucks does not induce refractoriness to the male effect in seasonally anestrus female goats. *J Anim. Reprod. Sci.* 92, 300-309.
- Veliz, F.G., Meza-Herrera, C.A., De Santiago-Miramontes, M.A., Arellano-Rodriguez, G., Leyva, C., Rivaz-Munoz, R., Mellado, M., 2009. Effect of parity and progesterone priming on induction of reproductive function in Saanen goats by buck exposure. *Livest. Sci.* 125, 261-265.
- Vidal, H., Batista, M., Bento de Silva, C., Gomes, A., Pelinca, A., Valcacia Silva, S., Pessoa Guerra, M., 2013. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Rumin. Res.* 109, 47-51.
- Vielma, J., Hernandez, H., Veliz, F., Flores, J., Duarte, G., Malpaux, B., Delgadillo, J., 2005. Buck vocalizations stimulate estrus behavior in seasonal anovulatory female goats. *Reprod. Domest. Anim.* 40, 360-368.
- Vielma, J., Chemineau, P., Poindron, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., 2009. Male sexual behavior contributes to the maintenance of high LH pulsatility in anestrus female goats. *Horm. Behav.* 56, 444-449.
- Villemure, M., Lazure, C., Manjunath, P., 2003. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:39.
- Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M., Rubianes, E., 1999. The effect of sublethal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 51, 1351–1361.
- Viñoles, C., Forsberg, M., Banchero, G., Rubianes, E., 2001. Effect of long-term and short-term progestagen treatment of follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55, 993–1004.
- Waheed, M.M., Ghoneim, I.M., Abdou, M.S.S., 2015. Morphometric Characteristics of Spermatozoa in the Arabian Horse With Regard to Season, Age, Sperm Concentration, and Fertility. *J. Equine Vet. Sci.* 35, 244-249.
- Wakabayashi Y., Nakada T., Murata K., Ohkura S., Mogi K., Navarro V.M., Clifton D.K., Mori Y., Tsukamura H., Maeda K., Steiner R.A., Okamura H. 2010. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J. Neurosci.* 30, 3124-3132.
- Walkden-Brown, S.W., 1991. Environmental and social influences on reproduction in Australian Cashmere goats. Tesis doctoral, Universidad de Queensland, Australia, p. 237.
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B., Henniawati, 1993. The male effect in the Australian cashmere goat. 3. Enhancement with buck nutrition and use of oestrous females. *Anim. Reprod. Sci.* 32, 69-84.
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Norton, B.W., Scaramuzzi, R.J., Martin, G.B., 1994. Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian cashmere goats. *J. Reprod. Fertil.* 102, 351-360.

- Walkden-Brown, S.W., Bocquier, F., 2000. Nutritional regulation of reproduction in goats. 7th International Conference on Goats France, pp. 389-395.
- Wulster-Radcliffe, M.C., Williams, M.A., Stellflug, J.N., Lewis, G.S. 2001. Technical note: artificial vagina vs. a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *J. Anim. Sci.* 79, 2964-2967.
- Wang, W., Luo, J., Sun, S., Xi, L., Gao, Q., Haile, A.B., Shi, H., Zhang, W., Shi, H., 2015. The effect of season on spermatozoa motility, plasma membrane and acrosome integrity in fresh and frozen-thawed semen from Xinong Saanen bucks. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 23-28.
- Whitley, N.C., Jackson, D.J., 2004. An update on estrus synchronization in goats: A minor species. *J. Anim. Sci.* 82, 270-276.
- Wildeus, S., 2000. Current Concepts in Synchronization of Oestrous: Sheep and Goats. *J. Anim. Sci.* 77, 1-14.
- Xu, C.-L., Zhou, J.-B., Zhao, B.-T., Lan, G.-C., Luo, M.-J., Chang, Z.-L., Sui, H.-S., Tan, J.-H., 2009. Liquid Storage of Goat Semen in Chemically Defined Extenders. *reprod. Domest. Anim.* 44, 771-778.
- Yániz J., Martí J.L., Silvestre M.A., Folch J., Santolaria P., Alabart J.L., López-Gatius F. 2005. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology*, 64, 1844-1851.
- Zamiri, M.J., Heidari, A.H., 2006. Reproductive characteristics of Rayini male goats of Kerman province in Iran. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 176-185.
- Zarazaga, L.A., Guzman, J.L., Dominguez, C., Perez, M.C., Prieto, R., 2009. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. *Theriogenology* 71, 1316-1325.
- Zarazaga, L.A., Gatica, M.C., Celi, I., Guzman, J.L., Malpaux, B., 2011. Artificial long days and daily contact with bucks induce ovarian but not oestrous activity during the non-breeding season in Mediterranean goat females. *Anim. Reprod. Sci.* 125, 81-87.
- Zarei, M.A., Farshad, A., Akhondzadeh, S., 2009. Variations in thyroidal activity during estrous cycle and natural breeding season in Markhoz goat breeds. *Pak. J. Biol. Sci.* 12, 1420-1424.
- Zarrouk, A., Souilem, O., Drion, P.V., Beckers, J.F., 2001. Caractéristiques de la reproduction de l'espèce caprine. *Ann. Méd. Vét.*, 145, 98-105.